Chemische Untersuchungen zur Struktur der Zellwandpolymere der Gattung Methanobacterium

Helmut König

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Chemische Untersuchungen zur Struktur der Zellwandpolymere der Gattung Methanobacterium

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Helmut König
aus
Beltheim

München 1979

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. O. Kandler
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Rüdiger
Einreichung der Arbeit:	23. 5. 1979
Annahme der Arbeit:	10. 7. 1979
Mündliche Prüfung:	20. 7. 1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS– UND FOTODRUCK FRANK
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Für Monika

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	10
2.1.	Organismen	10
2.2.	Gewinnung der Zellwände	10
2.3.	Extraktionsmethoden	11
2.3.1.	Extraktion mit Formamid	11
2.3.2.	Extraktion mit Phenol	11
2.3.3.	Extraktion mit Alkali	11
2.3.4.	Extraktion mit Trichloressigsäure	11
2.3.5.	Extraktion mit Methanol/Chloroform	11
2.3.6.	Extraktion mit Natriumdodecylsulfat	12
2.3.7.	Dialyse gegen Äthylendiamintetraessigsäure	12
2.3.8.	Dialyse gegen 0,01 N HCl	12
2.4.	Wasserlösliche Zellwandpräparationen	12
2.4.1.	NaOH-Behandlung	12
2.4.2.	Hydrazinolyse	13
2.4.3.	HF-Hydrolyse	13
2.4.3.1.	HF-Hydrolyse bei 0°C	13
2.4.3.2.	HF-Hydrolyse bei 30°C	13
2.5.	Enzymatische Behandlung	13
2.5.1.	Versuche zur Isolierung von Bruchstücken	13
2.5.1.1.	Proteinase K	14
2.5.1.2.	Endopeptidase L_{11}	14
2.5.1.3.	Pepsin	14
2.5.1.4.	Pronase	14
2.5.1.5.	Lysozym	14
2.5.1.6.	β-N-Ac-Glucosaminidase	15
2.5.1.7.	Glycosidasen-Mischung	15
2.5.2.	Konfigurationsbestimmung der Aminosäuren	15
2.5.2.1.	Alanin	15
2.5.2.2.	Lysin	16

		Seite
2.5.2.3.	Ornithin	16
2.5.2.4.	Glutaminsäure	16
2.5.2.5.	Threonin	16
2.6.	Hydrolysebedingungen	16
2.6.1.	Totalhydrolysen	16
2.6.1.1.	Aminosäuren und Aminozucker	17
2.6.1.2.	Neutralzucker	17
2.6.1.3.	Acetat	17
2.6.1.4.	DNP-Derivate	17
2.6.1.5.	Abspaltung der DNP-Gruppe	17
2.6.1.6.	Estergebundenes Sulfat	18
2.6.2.	Partialhydrolysen	18
2.6.2.1.	Saure Partialhydrolyse	18
2.6.2.2.	Alkalische Partialhydrolyse	18
2.6.2.3.	Peptide	18
2.6.2.4.	N-Ac-Glucosaminnachweis	18
2.7.	Chromatographische Verfahren	19
2.7.1.	Papierchromatographie	19
2.7.2.	Dünnschichtchromatographie	20
2.7.3.	Elektrophorese	20
2.7.4.	Aminosäureanalysator	21
2.7.4.1.	Aminosäuren und Aminozucker	21
2.7.4.2.	Peptide	21
2.7.5.	Gelfiltration	22
2.7.6.	Gaschromatographie	22
2.7.6.1.	Neutralzucker	22
2.7.6.2.	Organische Säuren und Alkohole	24
2.7.7.	Sprühreagenzien	24
2.7.7.1.	Ninhydrin für Aminoverbindungen	24
2.7.7.2.	Alkalisches Silbernitrat für Zucker	24
2.7.7.3.	Anilinphthalat für Zucker	25
2.7.7.4.	Morgan-Elson-Reagenz für N-Ac-Aminozucker	25
2.7.7.5.	Schwefelsäure für organische Verbindungen	25
2.7.7.6.	Cl_2/KJ-Reagenz für N-Acyl-Gruppen	25
2.7.7.7.	Salicylaldehyd für Hydrazide	26

		Seite
2.7.7.8.	Schiff-Perjodat-Reagenz für α-Diol-Gruppen	26
2.7.7.9.	Hydroxylamin/Fe^{3+}- Reagenz für Lactone	26
2.7.8.	Vergleichssubstanzen	27
2.8.	Qualitative und quantitative Bestimmungsmethoden	27
2.8.1.	Aminozucker	27
2.8.1.1.	Morgan-Elson-Test	27
2.8.1.2.	Elson-Morgan-Test	28
2.8.2.	Neutralzucker	29
2.8.2.1.	Glucose und Mannose	29
2.8.2.2.	Galactose	29
2.8.3.	Gesamtzucker	30
2.8.3.1.	Anthron-Test	30
2.8.3.2.	Phenol-Test	30
2.8.4.	Uronsäuren	31
2.8.5.	Acetat	31
2.8.6.	Estergebundene Acylgruppen	32
2.8.6.1.	Bestimmung mit Hydroxylamin	32
2.8.6.2.	Bestimmung durch Ammonolyse	33
2.8.6.3.	Bestimmung durch NaOH-Behandlung	33
2.8.7.	Glycerin	33
2.8.8.	Pyruvat	34
2.8.9.	Sulfat	34
2.8.10.	Phosphat	35
2.8.11.	Gesamtaminogruppen	35
2.8.12.	Freie Aminogruppen	36
2.8.12.1.	DNP-Aminosäuren für Standardzwecke	36
2.8.12.2.	DNP-Peptide	36
2.8.12.3.	DNP-Zellwände	36
2.8.12.4.	Quantitative Bestimmung	37
2.8.13.	Amidstickstoff	37
2.8.14.	Bestimmung freier Carboxylgruppen durch Hydrazinolyse	37
2.8.14.1.	Herstellung von wasserfreiem Hydrazin	37
2.8.14.2.	Hydrazinolyse	38
2.8.14.3.	Nachweis von Di-DNP-Glutaminsäure-Monohydraziden	38

		Seite
2.8.15.	Bestimmung freier Carboxylgruppen durch Reduktion	39
2.8.15.1.	Veresterung mit Diazomethan	39
2.8.15.2.	Veresterung mit methanolischer HCl	39
2.8.15.3.	Veresterung mit Methanol/Acetanhydrid	39
2.8.15.4.	Reduktion mit $LiBH_4$	40
2.8.15.5.	Veresterung mit Methanol/Dowex H^+	40
2.8.16.	Bestimmung freier Carboxylgruppen durch Photolyse	40
2.8.17.	Reduzierende Gruppen	41
2.8.18.	Bestimmung freier C_1-Gruppen an Glucosaminpolymeren	41
2.8.19.	Ascheanalyse	42
2.8.19.1.	Aschegehalt	42
2.8.19.2.	Kationen	42
2.8.20.	C,N,H-Elementaranalyse	42
2.9.	Perjodatbehandlung	43
2.10.	Bestimmung der anomeren Konfiguration	43
2.11.	Ninhydrinabbau von Aminohexosen	44
2.12.	β-Elimination	44
2.13.	Elektronenmikroskopie	44
3.	ERGEBNISSE	45
3.1.	Morphologie der Zellwandpolymere	45
3.1.1.	Bacilloider Typ	45
3.1.2.	Kokkoider Typ	47
3.2.	Chemische Zusammensetzung	48
3.2.1.	C,N,H-Analyse	48
3.2.2.	Aminosäuren und Aminozucker	49
3.2.2.1.	Aminosäuren und Aminozucker der Zellwandsacculi von M. thermoautotrophicum	49
3.2.2.2.	Aminosäuren und Aminozucker der Zellwandsacculi der übrigen untersuchten Stämme	53
3.2.3.	Talosaminuronsäure	54
3.2.3.1.	Isolierung und vorläufige Charakterisierung	55
3.2.3.2.	Endgültige Identifizierung	58
3.2.4.	Neutralzucker	60

		Seite
3.2.5.	Sulfat und Phosphat	61
3.2.6.	Ascheanalyse	62
3.2.7.	Zusammenstellung der Zellwandkomponenten	63
3.3.	Versuche zur Strukturaufklärung	65
3.3.1.	Versuche zur Auftrennung in verschiedene Polymere durch Extraktion oder Enzymbehandlung	65
3.3.2.	Charakterisierung der Peptidkomponente	68
3.3.2.1.	Isolierung und Identifizierung von überlappenden Peptiden	68
3.3.2.2.	C- und N-terminale Aminosäuren des intakten Sacculus	73
3.3.3.	Charakterisierung der Glycankomponente	76
3.3.3.1.	Isolierung	76
3.3.3.2.	Molekulargewicht	76
3.3.3.3.	Zusammensetzung	78
3.3.3.4.	Bindung der Peptideinheit an den Glycanstrang	83
3.3.3.5.	Verknüpfung der Glycanmonomeren	84
3.3.4.	Charakterisierung der Untereinheiten	86
3.3.4.1.	Hydrolyse der Sacculi mit Fluorwasserstoff	86
3.3.4.2.	Analyse des Gesamthydrolysates	87
3.3.4.3.	Auftrennung des HF-Hydrolysates auf Sephadex	88
4.	DISKUSSION	94
5.	ZUSAMMENFASSUNG	103
6.	LITERATURVERZEICHNIS	105

ABKÜRZUNGEN

ATP	=	Adenosintriphosphat
DMF	=	Dimethylformamid
DMSO	=	Dimethylsulfoxid
EDTA	=	Äthylendiamintetraessigsäure
FAD	=	Flavin-Adenin-Dinucleotid
FDNB	=	Fluordinitrobenzol
Gal-DH	=	Galactose-Dehydrogenase
G-6-P-DH	=	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
HK	=	Hexokinase
NAD	=	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADP	=	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
PGI	=	Phospho-Glucose-Isomerase
PMI	=	Phospho-Mannose-Isomerase
RT	=	Raumtemperatur
SDS	=	Natrium-Dodecylsulfat
TES (TCA)	=	Trichloressigsäure
tryp	=	Trypsin-behandelt
ZW	=	Zellwand

1. EINLEITUNG

Die Methanbildung durch Mikroben ist schon Ende des vorigen Jahrhunderts beim Studium der Zellulosegärung entdeckt worden (Popoff 1875; Hoppe-Seyler 1886, 1887; Omelianski 1902). Dennoch blieben die Methanbakterien lange Zeit wenig untersucht. Erst in jüngster Zeit ist das Interesse an diesen Organismen stark gestiegen, bedingt durch die Erkennung ihrer systematischen Sonderstellung (Woese et al. 1978) und der interessanten energetisch-ökologischen Gesichtspunkte (Baader et al. 1978; Rohlich et al. 1977). Veröffentlichungen von Barker 1936a, 1936b, 1956, Stadtman 1967, Wolfe 1971, Mah et al. 1977, Zeikus 1977, Thauer und Fuchs 1979 geben einen Überblick über den jeweiligen Stand des Wissens.

Ökologie und Syntrophismus

Man nimmt an, daß die Methanbakterien schon vor 3 Milliarden Jahren existierten (Kandler 1979). Zu dieser Zeit herrschte auf der Erde eine reduzierende Atmosphäre. In strikt anaeroben ökologischen Nischen konnten sie bis heute überleben. Nach Wolfe und Winter (1978) lassen sich drei Biotope unterscheiden:

1. Süß- und Meerwassersedimente, Faulschlamm und zersetzendes Holz,
2. Verdauungstrakt der Wirbeltiere,
3. Thermalquellen.

Mc Inerney und Bryant (1978) unterscheiden verschiedene Stufen des Abbaus von organischem Material zu Methan mit jeweils eigener Bakterienflora.

1. In der ersten Stufe werden polymere organische Verbindungen zu Monomeren hydrolysiert und diese zu Säuren und Alkoholen umgesetzt. Letztere werden von den gleichen Organismen teilweise zu Acetat, CO_2, H_2 und NH_3 abgebaut.

2. Die Population der 2. Stufe setzt die in der ersten Stufe nicht abgebauten Säuren und Alkohole zu Acetat, H_2 und CO_2 um.
3. Die 3. Stufe bilden die Methanbakterien, die mit CO_2 und H_2 unter Methanbildung autotroph leben. Sie sind in der Lage, auch Acetat unter Methan- und CO_2-Bildung anaerob als Energiequelle zu verwenden.

Weiterhin wird der H_2-Partialdruck niedrig gehalten, eine Voraussetzung für das Funktionieren des 2. Schrittes. In Thermalquellen spielt der Syntrophismus eine geringere Rolle, da CO_2 und H_2 vulkanischen Ursprungs sind. Bei Wiederkäuern tritt wegen der Resorption der Säuren nur Schritt 1 und 3 auf.

In der Natur scheint der Wasserstoff der limitierende Faktor der Methanbildung zu sein. In Gegenwart von anorganischen Elektronen-Akzeptoren wie Sulfat, Nitrat und Sauerstoff wird die Methanbildung gehemmt. Sulfatreduzierende und denitrifizierende Bakterien verwenden den Wasserstoff zur Reduktion von Sulfat und Nitrat (Balderston und Payne 1976; Winfrey und Zeikus 1977; Abram und Nedwell 1978; Bryant et al. 1977). In Mischungen von Reinkulturen tritt in Gegenwart von Methanbakterien eine Verschiebung der Endprodukte des Stoffwechsels ein. Selenomonas ruminantium, Ruminococcus flavefaciens, Chlostridium thermocellum und der "S-Organismus" produzieren in syntrophen Kulturen mehr Wasserstoff und Acetat als in Monokulturen (Chen und Wolin 1977; Latham und Wolin 1977; Weimer und Zeikus 1977; Bryant et al. 1967). Ein vollständiger Abbau von Fructose zu CO_2 und CH_4 gelang durch eine Kombination von Acetobacterium woodii und Methanosarcina barkeri (Wolfe und Winter 1978).

Morphologie

Die Methanbakterien zeigen in der Morphologie eine große Vielfalt. Zeikus und Bowen (1975a) beschreiben vier Zelltypen.

1. Der Bacillustyp enthält stäbchenförmige Bakterien, die sich zu Ketten zusammenlagern können. In diese Gruppe gehören Methanobacterium arbophilicum, M. formicicum, M.spec. M.o.H. und M. thermoautotrophicum. Sie besitzen eine Zellwand, wie sie für gram-positive Bakterien charakteristisch ist. Bei M. thermoautotrophicum erreicht sie eine Dicke von 16,5 nm (Zeikus und Wolfe 1973). Das Cytoplasma enthält eine granuläre Ribosomen- und eine zentrale DNA-Region, aber keine Reservestoffe. Zahlreiche Membransysteme mit unbekannter Funktion durchziehen das Cytoplasma. Die Membranen lagern sich zu einer stäbchenförmigen, zirkulären Struktur von 13 nm Durchmesser zusammen. Sie entstehen als Einstülpung der Cytoplasmamembran.
2. Zum Sarcinatyp gehört Methanosarcina barkeri. Die Zellen sind wie bei Sarcina ventriculi zu Paketen zusammengelagert. Die Wand zeigt einen zweischichtigen Aufbau. Die Gramfärbung ist positiv. Die laminäre, amorphe äußere Lage geht in eine elektronendichtere Schicht über,die der Cytoplasmamembran aufgelagert ist. Durch Teilung in verschiedenen Ebenen entstehen ungleiche Tochterzellen. Intracytoplasmatische Membranen vom mesosomalen und vesikulären Typ sind vorhanden. Besonders in der lag-Phase sind elektronendichte Granula zu erkennen. Zhilina (1971) beschreibt einen Methanosarcinaspecies, der eine dreischichtige Zellwand aufweist und im Cytoplasma Gasvakuolen enthält.
3. Methanobacterum ruminantium, ein Vertreter des Coccustyps, zeigt einen dreischichtigen Zellwandaufbau von 15 nm Dicke (Langenberg et al. 1968). Die elektronendichte Innenlage ist 1,5 - 2 nm dick. Es folgt eine transparentere Mittellage von 7 - 10 nm Dicke die in eine unregelmäßige, dünne Aussenlage (1,5 - 2 nm) übergeht. Zeikus und Bowen (1975a) geben eine Gesamtdicke von 30 - 40 nm an. Außer Mesosomen sind keine intracytoplasmatischen Membransysteme vorhanden. Während M. ruminantium sich gram-positiv verhält, sind die eigentlichen Methano-

coccen gram-negativ (Johnes et al. 1977). Methanococcus vannielii bildet unregelmäßige Zellformen von 1 - 4 µm Durchmesser und besitzt somit Ähnlichkeiten mit den L-Formen. Wie bei Halobacterium, Sulfolobus, Acinetobacter und Spirillum serpens umgibt die Zellen eine Lage aus Proteinuntereinheiten (Kandler 1979).

4. Methanospirillum hungatii, der einzige Vertreter des Spirillum-Typs, besitzt polare Flagellen und eine fibrilläre Oberfläche (Ferry et al. 1974, Zeikus und Bowen 1975b). Die Zellen sind umgeben von einer 9,5 nm dicken Schicht. Nach Innen folgt eine elektronendichtere Lage von 13,6 nm. Nur die Cytoplasmamembran ist an der Zellteilung beteiligt (Kandler 1979). Die äußerste Lage umgibt die Tochterzellen scheidenartig. Die einzelnen Zellen eines Filamentes sind durch einen Spacer getrennt. Die Filamentenden zeigen einen Raum ohne Cytoplasma. Granuläre Einschlüsse mit geringer Elektronendichte und Membranbodies sind im Cytoplasma nachweisbar.

Stoffwechsel und Energiegewinnung

Die Methanbakterien sind strikt anaerobe Organismen. Daher mußten spezielle Techniken zur Isolierung und Kultur entwickelt werden (Hungate 1950, 1969; Bryant et al. 1968; Wolfe 1971; Edwards und Mc Bride 1975; Balch und Wolfe 1976; Mink und Dugan 1977). Alle Methanbakterien wachsen autotroph auf einem Mineralmedium mit CO_2 und H_2 als einziger Kohlenstoff und Energiequelle. Außerdem können einige Acetat, Formiat, Methanol oder Kohlenmonoxid verwerten. Als N-und S-Quelle dienen NH_4-Salze und Sulfide. (Smith und Mah 1966; Stadtman und Barker 1951; Zeikus et al. 1975; Mah et al. 1978; Weimer und Zeikus 1978).

An der Methanbildung sind bisher unbekannte Coenzyme beteiligt. Von 2 Cofaktoren konnte die Struktur und Funktion aufgeklärt werden. Weitere sind bereits isoliert (Gunsalus und Wolfe 1978a).

1972 isolierten Cheeseman et al. den Faktor 420, eine

fluoreszierende Verbindung mit einem Absorptionsmaximum bei 420 nm. F_{420} fungiert als Elektronencarrier im NADP-Hydrogenase-System und im Formiathydrogenlyase-System (Tzeng et al. 1975a, 1975b). Eirich et al. (1978) identifizierten F_{420} als den N-(N-L-lactyl-γ-L-glutamyl)-L-Glutaminsäure-Phosphodiester von 7,8-Didemethyl-8-hydroxy-5-deazariboflavin-5'-phospat.

CoM wurde in Zellextrakten von Methanobacterium spec. M.o.H. von Mc Bride und Wolfe (1971) entdeckt. Es handelt sich um 2-Mercaptoäthansulfonsäure, den kleinsten bisher bekannten Cofaktor. CoM ist als Endcarrier bei der Methanfreisetzung beteiligt (Taylor und Wolfe 1974a, 1974b). Dieser Schritt wird durch eine Mg^{++}-ATP-abhängige CH_3-S-CoM-Methylreduktase katalysiert (Gunsalus und Wolfe 1978b). Methan kann auch aus künstlichen Vorstufen wie Methylcobalamin und Methyltetrahydrofolat freigesetzt werden (Blaylock und Stadtman 1966).

Drei Wege der CO_2-Fixierung sind in Bakterien bekannt, der Calvincyclus bei photosynthetischen und einigen autotrophen Bakterien, der Serin- und Hexulose-Phosphat-Weg bei methylotrophen Bakterien (Quayle 1972) und ein reduktiver Tricarbonsäurezyklus bei Chlorobium (Buchanan et al. 1972). Bei Methanobacterium thermoautotrophicum wurde eine unvollständiger Tricarbonsäurezyklus nachgewiesen, über den CO_2 fixiert und Zellkohlenstoff bereitgestellt wird (Zeikus et al. 1977; Fuchs und Stupperich 1978; Fuchs et al. 1978a). α-Ketoglutarat wird durch reduktive Carboxylierung von Succinyl-CoA gebildet. Methanosarcina bildet α-Ketoglutarat über den Isocitrat-Dehydrogenase-Weg (Weimer und Zeikus 1979). Die Leitenzyme des Pentosephosphatcyclus und des Serin- und Hexulose-Phosphatweges fehlen jedoch.

Wie die notwendige Energie für den Stoffwechsel bereitgestellt wird, ist noch nicht geklärt. Es wird angenommen, daß die ATP-Synthese über einen chemiosmotischen Mechanismus erfolgt (Thauer und Fuchs 1979). Cytochrome und Menachinone konnten nicht nachgewiesen werden. Das von einigen Anaerobiern entwickelte Fumerat-Reductase-System wurde bei

Methanobakterien nicht gefunden (Fuchs et al. 1978b).

Von Doddema et al. (1979) wurde in M. thermoautotrophicum ein membrangebundener ATP-Synthese-Komplex nachgewiesen. Die ATP-Synthese kann durch einen künstlichen Protonengradienten induziert werden. Die Synthese ist Mg^{++}-abhängig und erfolgt auch in Gegenwart von Sauerstoff.

Biochemische Merkmale

16s rRNA

Die Sequenzierung der Oligonukleotide der 16s rRNA, die nach Verdauung mit T_1-Ribonuclease und zweidimensionaler Trennung (Elektrophorese und Chromatographie) erhalten wurden, zeigte nur geringe Übereinstimmung mit den Oligonukleotiden der Eubakterien und Chloroplasten. (Woese und Fox 1977; Balch et al. 1977; Fox et al. 1977). Ein Maß für die Ähnlichkeit ist der S_{AB}-Wert. Da sich die rRNA konservativ verhält, lassen sich daraus phylogenetische Beziehungen ableiten. Der S_{AB}-Wert von nur 0,1 zwischen Methanbakterien und "klassischen" Bakterien deutet darauf hin, daß sich die Methanbakterien in der Evolution schon sehr früh von den Eubakterien getrennt haben, schon zu einer Zeit, als die Trennung der Eubakterien und der Cyanobakterien noch nicht erfolgt war (S_{AB}-Wert zwischen letzteren beträgt 0,25).

tRNA

Die tRNA der Bakterien und Eukaryonten enthält die modifizierte Sequenz TΨCG. Diese ist bei den methanogenen Bakterien abgeändert. In der Gruppe I hat sie die Zusammensetzung ΨΨ̇CG, in der Gruppe II ÜΨ̇CG. Die üblichen Methylnucleoside 7-Methylguanosin und Ribothymidin fehlen. (Best 1978).

Lipide

Die Lipide der Methanbakterien wie auch die der Halobakterien, Sulfolobus und Thermoplasma enthalten keine Fett-

säureester. Diese sind durch nicht verseifbare Glycerin-Phytoläther ersetzt (Tornabene et al. 1978; Makula und Singer 1978), möglicherweise eine Anpassung an extreme Biotope.

Zellwand

Zellwanduntersuchungen von Kandler und Hippe (1977) zeigten, daß Methanosarcina barkeri einen Heteropolysaccharidsacculus, bestehend aus Galactosamin, Neutralzuckern und Uronsäuren, besitzt. Muraminsäure und Aminosäuren fehlen dagegen. Somit besteht ein wesentlicher Unterschied zu den bisher untersuchten Eubakterien, die alle Murein aufweisen.

Ribosomen

Die Ribosomen bestehen wie bei anderen Procaryonten aus 30 S und 50 S Untereinheiten. 23 S, 16 S und 5 S RNA's sind vorhanden (Woese et al. 1978). Auffallend ist aber der hohe Anteil an sauren Proteinen von 30 - 40% (Douglas und Achatz 1979). Fast ausschließlich aus sauren Proteinen bestehen die Ribosomen der extrem halophilen Bakterien.

DNA-abhängige RNA-Polymerase

Das Core-Enzym der RNA-Polymerasen der bisher untersuchten Procaryonten besteht aus 3 verschiedenen Untereinheiten, von denen die Untereinheit β Rifampicin bindet. Bei M. thermoautotrophicum wurde dagegen eine rifampicinresistente, DNA-abhängige Polymerase nachgewiesen. Sie ist sauerstoffempfindlich und Mg^{2+}-abhängig. Sie ist aus 6 Untereinheiten mit Molekulargewichten von 101 000, 75 000, 57 000, 52 000, 38 000 und 25 000 zusammengesetzt (Stetter et al. 1979). Die Polymerasen anderer Archaebakterien wie Halobacterium halobium besitzt 7, die von Sulfolobus acidocaldarius 10 verschiedene Untereinheiten (Zillig et al. 1978, Stetter pers. Mitteilung, Zillig et al. 1979) .

Systematische Stellung

1936 war noch kein Vertreter der Methanbakterien in den taxonomischen Standardwerken aufgeführt (Bergey 1934; Lehmann und Neumann 1927), obwohl erste Isolate schon von Söhngen (1906) vorgenommen wurden. Kluyver und van Niel (1936) teilten in ihrem System die Methanbakterien in 3 Gattungen ein: Methanobacterium, Methanococcus und Methanosarcina. Die Gattungen wurden später auf Grund morphologischer Gesichtspunkte den Bacillaceen und Micrococcaceen zugeordnet (Bergey 1957). Ihrer physiologischen Besonderheiten wegen faßte Barker (1956) die Methanbakterien zu einer Familie zusammen. Auch Bryant (1974) folgte dieser Vorstellung. Wie neuere Untersuchungen zeigten, bilden die Methanbakterien mit den Halobakterien, Sulfolobus und Thermoplasma einen eigenen phylogenetischen Zweig, der sich schon früh in der Evolution von den übrigen Prokaryonten und Urkaryonten abgespalten hat (Woese und Fox 1977; Woese et al. 1978).

Diese "Archaebakterien"sind gekennzeichnet durch charakteristische tRNAs, rRNAs, RNA-Polymerasen, ribosomale Proteine, Zellwandaufbau, Lipidzusammensetzung, Stoffwechselwege und ungewöhnliche Biotope.

Trotz dieser Sonderstellung wurden auch Gemeinsamkeiten mit den Eukaryonten entdeckt: ein histonähnliches Protein bei Thermoplasma (Searcy 1975), Glycoproteine (Mescher und Strominger 1978) und Bacteriorhodopsin (Oesterhelt und Stoeckenius 1973) bei Halobakterien, die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz des N-terminalen Endes der L 7 und L 12 Proteine von Saccharomyces cerevisiae und Artemia salina und des homologen L 20 Proteins von Halobacterium citirubrum (Amons et al. 1977).

Wegen diesen Befunden nahmen Balch et al. (1979) eine völlig neue Bearbeitung der Systematik der methanogenen Bakterien vor. Die methanogenen Bakterien stellen allerdings

keine einheitliche Gruppe dar. Dieses geht aus den unterschiedlichen GC-Verhältnissen (Balch et al. 1979), den S_{AB}-Werten (Fox et al. 1977) , den Stoffwechselwegen (Thauer und Fuchs 1979) und der Morphologie (Zeikus und Bowen 1975a) hervor.

Zielsetzung

Fast alle untersuchten Bakterien (Schleifer und Kandler 1972) und Blaualgen (Höcht et al. 1965) enthalten als Festigungselement der Zellwand einen Mureinsacculus. Als Ausnahmen waren Mycoplasmen, Thermoplasma und Spiroplasma (Freundt 1974), Halobacterium (Gibbons 1974), Halococcus (Steber und Schleifer 1975) und Sulfolobus (Brock 1974) bekannt.

Über 100 Peptidoglycantypen sind gefunden worden, die in der Diaminosäure und der Art der Interpeptidbrücke variieren (Kandler 1979). Der Peptidoglycantyp ist genetisch fixiert. Nur einzelne Aminosäuren können unter bestimmten Kulturbedingungen ausgetauscht werden. Die Zellwand stellt somit ein wichtiges taxonomisches Merkmal dar.

In der vorliegenden Arbeit werden die Zellwände der bisher bekannten Species der Gattung Methanobacterium untersucht. Da die Methanbakterien physiologisch schwer zu differenzieren sind, könnte die Zellwandanalyse neben der Morphologie ein biochemisches Merkmal zur Unterscheidung der Methanbakterien darstellen. Außerdem ist von Interesse, ob die systematische Sonderstellung der methanogenen Bakterien auch ihren Niederschlag in der Zellwandzusammensetzung der Gattung Methanobacterium findet, wie sie schon für Methanosarcina nachgewiesen wurde (Kandler und Hippe 1977).

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Organismen

Die Organismen wurden als gefriergetrocknete Zellen von folgenden Instituten für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt:

M. arbophilicum, M. formicicum, M. spec. M.o.H., ruminantium M1, M. thermoautotrophicum von Balch, W. E., Romesser, J., und Wolfe, R.S., University of Illinois, Urbana, USA,

M.spec. M.o.H.-G, M. ruminantium PS von Schobert, S., Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen,

M. spec. AZ, M. spec. (Isolat aus einer Anreicherungskultur von Pantskhava) von Winter, J., Botanisches Institut der Universität München,

M. thermoautotrophicum Stamm Marburg von Fuchs, G., Botanisches Institut der Universität Marburg.

2.2. Gewinnung der Zellwände (Schleifer und Kandler 1967b)

Die lyophilisierten Zellen wurden im Homogenisator (Bühler, Tübingen) mit Glasperlen von 0,17 - 0,18 mm Durchmesser (Braun-Apparatebau, Melsungen) in etwa 20 min. zerschlagen. Die Überprüfung erfolgte im Phasenkontrastmikroskop. Das Zellhomogenisat wurde mit einer Schott-G-1-Fritte von den Glasperlen getrennt. Die rohen Zellwände wurden 20 min. bei 20 000 U/min. in der Sorvall-Kühlzentrifuge im SS-34-Rotor abzentrifugiert. Das Sediment (ca. 5 - 20 mg/ml) wurde in 0,05 m Phosphatpuffer pH 7,8 mit dem Ultraturax (IKA-Werk, Staufen) suspendiert und kurz aufgekocht. Die Suspension wurde mit 0,5 mg Trypsin/ml (Merck) versetzt, mit Toluol überschichtet, über Nacht bei 37°C inkubiert, dann zentrifugiert und viermal mit destilliertem Wasser gewaschen. Nach anschließender Gefriertrocknung (WKF-Gefriertrockenanlage L05-60) wurde das restliche Wasser (ca. 10%) über Nacht im Trockenschrank bei 105°C

entfernt. Die so erhaltenen Zellwände wurden im Exikator über $CaCl_2$ aufbewahrt.

2.3. Extraktionsmethoden

2.3.1. Extraktion mit Formamid (Schleifer et al. 1968)

Zellwände (5 mg/ml) wurden in Formamid bei 170°C am Rückflußkühler 20 min. erhitzt. Die Zellwände wurden abzentrifugiert, der Überstand dialysiert und abgeblasen. Zellwände und Überstand wurden untersucht.

2.3.2. Extraktion mit Phenol (Westphal und Jann 1965)

5 mg Zellwände wurden in 0, 5 ml H_2O suspendiert und auf 68°C erhitzt. 0,5 ml 88%iges Phenol von 68°C wurde zugegeben. Die Suspension wurde 20 min. bei 68°C geschüttelt. Nach Zentrifugation wurden die phenolische Unterphase, die wässrige Oberphase und der Niederschlag getrennt untersucht.

2.3.3. Extraktion mit Alkali (Steber 1976)

5 mg Zellwände wurden in 1 ml 0,5 NaOH 20 h bei Raumtemperatur geschüttelt.

2.3.4. Extraktion mit Trichloressigsäure (Chatterjee 1969)

5 mg ZW wurden in 5 ml 5%iger TES suspendiert und 45 min. auf 60°C erhitzt.

2.3.5. Extraktion mit Methanol/Chloroform (Bligh und Dryer 1959)

100 mg ZW wurden in 25 ml Methanol/Chloroform/H_2O 65/30/30 gegeben und 1 h bei Raumtemperatur gerührt und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Anschließend wurden je 15 ml

Chloroform und H_2O zugegeben. Die untere Chloroformphase wurde mit einer Pipette entfernt und abgeblasen. Die wässrige Phase wurde zentrifugiert und abgeblasen.

2.3.6. Extraktion mit Natriumdodecylsulfat (Wietzerbin-Falszpàn et al. 1973)

10 mg Zellwände wurden mit Ultraschall in 1 ml H_2O suspendiert. Unter Schütteln wurde 1 ml 4% SDS-Lösung zugegeben. Die Suspension wurde 10 - 30 min. in kochendes Wasser gestellt. Dann wurde 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Zentrifugation wurde der Niederschlag getrocknet. Der Überstand wurde 2 Tage gegen H_2O dialysiert (Dialysis Membrane, Union Carbide Corporation) und abgeblasen.

2.3.7. Dialyse gegen Äthylendiamintetraessigsäure

150 mg Zellwände wurden 24 Stunden gegen zweimal 0,5 l 0,1 m EDTA (Merck) pH 8, eingestellt mit NaOH und anschließend 24 Stunden gegen H_2O dest. dialysiert.

2.3.8. Dialyse gegen 0,01 N HCl

Die Dialyse der Zellwände (5 mg/4 l) gegen 0,01 N HCl erfolgte bei 3°C für 48 h.

2.4. Wasserlösliche Zellwandpräparationen

2.4.1. NaOH-Behandlung

100 mg Zellwände wurden in 2 ml 2 n NaOH bei 60°C 16-48 h inkubiert. Außerdem wurden Zellwände unter reduktiven Bedingungen behandelt. 100 mg ZW wurden in 1 ml H_2O suspendiert und mit 100 mg $NaBH_4$ 4h bei RT vorinkubiert. Dann wurde 1ml 4 n NaOH zugegeben, und 16 h bei 60°C erhitzt.

Nach Dialyse wurde eine weitere Fraktionierung auf Sephadex G 50 vorgenommen. Die einzelnen Fraktionen wurden im

Vakuum eingeengt, gefriergetrocknet und bei 105°C nachgetrocknet.

2.4.2. Hydrazinolyse

100 mg Zellwände wurden in 5 ml wasserfreiem Hydrazin 10 h bei 100°C oder ca. 88 h bei 80°C erhitzt.

2.4.3. HF-Hydrolyse (Mort und Lamport 1977; Fiedler, F., pers. Mitteilung)

2.4.3.1. HF-Hydrolyse bei 0°C

5 mg Zellwände wurden unter Eiskühlung mit 0,7 ml wässriger 70%iger Fluorwasserstoffsäure (Baker) für 3 h in Polyäthylenzentrifugenbechern inkubiert. Mit einer Ölpumpe wurde der Fluorwasserstoff über NaOH abgezogen , der Rückstand in 0,5 ml Eiswasser suspendiert und nochmals im Vakuum getrocknet. Es wurde ein Tropfen Phenolrot als Indikator zugegeben und mit 0,1 n LiOH neutralisiert.

2.4.3.2. HF-Hydrolyse bei 30°C

Die Methode wurde modifiziert. Anstelle von reinem HF wurde 70% HF verwendet.

20mg ZW wurden in 1 ml 70%iger HF suspendiert und 24h bei 30°C inkubiert. Nach Entfernung der Flußsäure und Neutralisation wurde eine weitere Auftrennung über Sephadex G50 und G25 vorgenommen.

2.5. Enzymatische Behandlung

2.5.1. Versuche zur Isolierung von Bruchstücken

Die Probe wurde mit Ultraschall in dem entsprechenden Puffer suspendiert und 16 h bei 37°C inkubiert. Während der Inkubation wurde die Änderung der Trübung bei 578 nm mit

einer unbehandelten Probe verglichen oder im Falle einer Glycosidasebehandlung die reduzierenden Gruppen bestimmt. Unlösliche Proben wurden abzentrifugiert, 4x mit H_2O gewaschen und getrocknet. Aus dem Überstand wurde das Enzym durch Kochen oder mit 10% TCA ausgefällt und die Säure mit Äther extrahiert. Niederschlag und Überstand wurden auf ihre Zusammensetzung untersucht.

2.5.1.1. Proteinase K (Merck 1974)

Inkubationsansatz: 10mg Zellwände
1ml 0,1 m Boratpuffer pH 7,5 (0,01 m $CaCl_2$, 0,005 m NaCl, 6 m Harnstoff)
10 µl Proteinase-K-Lösung, 1 mg/ml (Merck)

2.5.1.2. Endopeptidase L_{11} (Kato und Strominger 1968)

Inkubationsansatz: 3 mg Zellwände
1 ml 0,005 m Phosphatpuffer pH 6,8
0,1 mg L_{11}-Enzym (Kato, W. Hammes)

2.5.1.3. Pepsin (Merck 1974)

Inkubationsansatz: 10 mg Zellwände
1 ml 0,01 n HCl
0,5 mg Pepsin (Merck)

2.5.1.4. Pronase (Merck 1974)

Inkubationsansatz: 20 mg Zellwände
1 ml 0,07 Phosphatpuffer pH 7,4
40 µl Pronase-Lösung, 1 mg/ml (Boehringer)

2.5.1.5. Lysozym (Schleifer et al. 1969)

Inkubationsansatz: 5 mg Zellwände
1 ml 0,1 m Ammoniumacetatpuffer

pH 6,2
1 mg Lysozym (Boehringer)

NH_4-Acetat wurde durch Sublimation über P_2O_5 im Vakuum entfernt.

2.5.1.6. β-N-Ac-Glucosaminidase (Tipper 1968)

Inkubationsansatz:
1 ml Probe (1µMol GlcN)
1 ml 0,01 m Na-Citratpuffer pH 4,7 (enthält 0,01% Serumalbumin)
50 µl Enzymsuspension (5 mg/ml, Boehringer)

2.5.1.7. Glycosidasen-Mischung (Fukuda et al. 1969)

Inkubationsansatz:
10 mg Zellwände
1 ml 0,1 m Acetatpuffer pH 4,0
1 mg Glycosidase-Mischung (11 Aktivitäten) von Charonia lampas (Miles)

2.5.2. Konfigurationsbestimmung der Aminosäuren

Die quantitative Bestimmung vor und nach der enzymatischen Behandlung erfolgte mit Hilfe des Aminosäureanalysators.

2.5.2.1. Alanin (Larson et al. 1971)

Inkubationsansatz:
0,35 µMol Alanin
0,5 ml 0,1 m Phosphatpuffer pH 8,3, enthält 13 mg FAD,
1 ml 0,02 m Phosphatpuffer pH 8,3 enthält 33 µl Katalase (Suspension in 30% Glycerin, 260 U/ml, Boehringer)
0,5 ml 0,02 m Phosphatpuffer pH 8,3 enthält 50 µg D-Aminosäure-Oxidase (5 mg/ml, Boehringer) 1 h, 37°C,

Während der Inkubation wurde durch das Gemisch Sauerstoff geperlt.

2.5.2.2. Lysin (Bergmeyer 1974)

Inkubationsansatz:
0,32 µMol Lysin
0,1 ml 0,5 m Acetatpuffer pH 6,0
0,2 mg L-Lysindecarboxylase
(1,5 U/mg, Sigma)
1 h, 37°C

2.5.2.3. Ornithin (Bergmeyer 1974)

Inkubationsansatz:
0,18 µMol Ornithin
0,1 ml 0,1 m Acetatpuffer pH 5
0,5 mg L-Ornithindecarboxylase
(0,06 U/mg, Sigma)
7 h, 37°C

2.5.2.4. Glutaminsäure (Bergmeyer 1974)

Inkubationsansatz:
0,28 µMol Glutaminsäure
0,1 ml 0,1 m Acetatpuffer pH 5
0,2 mg L-Glutaminsäuredecarboxylase (4,3 U/mg, Sigma)
2 h, 37°C

2.5.2.5. Threonin (Birnbaum et al. 1952)

Inkubationsansatz:
0,22 µMol Threonin (N-acetyliert)
0,1 ml 0,1 m Phosphatpuffer pH 7,0
0,2 mg Acylase I (65 U/mg, Serva)
17 h, 25°C

N-Acetylierung:
0,22 µMol Threonin
100 µl gesättigte $NaHCO_3$-Lsg.
100 µl 2% Essigsäureanhydrid in Aceton
5 min, RT
neutralisieren, abblasen

2.6. Hydrolysebdingungen

2.6.1. Totalhydrolysen

2.6.1.1. Aminosäuren und Aminozucker (Schleifer und Kandler 1967b)

Zur quantitativen Bestimmung der Aminosäuren und Aminozucker mit dem Aminosäureanalysator wurden die Zellwände in zugeschmolzenen Fiolaxröhrchen mit 4 n HCl (0,1 ml/mg) bei 100°C 16h hydrolysiert. 6n HCl und 120°C waren für die vollständige Zellwandhydrolyse von M. ruminantium notwendig. Zur Bestimmung der Aminozucker allein waren 4n HCl, 100°C und 4 h ausreichend. Peptide wurden wie Zellwände hydrolysiert.

2.6.1.2. Neutralzucker

Neutralzucker wurden mit 2 n HCl, 2 h bei 100°C oder mit ähnlicher Ausbeute mit 2n TFA 4 h bei 100°C hydrolysiert.Diese Bedingungen wurden durch Hydrolysekinetik (4n TFA, 1h, 2h, 4h, 6 1/2h) ermittelt.

2.6.1.3. Acetat (Steber 1976)

Zur Bestimmung des Gesamtacetats wurde mit 4 n HCl 2h bei 100°C hydrolysiert. Die Röhrchen wurden eisgekühlt, aufgebrochen und mit gesättigter $NaHCO_3$-Lösung neutralisiert.

2.6.1.4. DNP-Derivate (Schleifer und Kandler 1968)

DNP-Zellwände und DNP-Peptide wurden entweder mit 4n HCL 16h oder mit 6n HCl 6h bei 100°C hydrolysiert.

2.6.1.5. Abspaltung der DNP-Gruppe (Mills 1950)

DNP-Aminosäuren und DNP-Hydrazide wurden im Zweifelsfalle als Aminosäuren nachgewiesen. Dazu wurden sie in gesättigter $Ba(OH)_2$-Lösung 1h bei 100°C erhitzt. Das Barium wurde mit CO_2 ausgefällt.

2.6.1.6. Estergebundenes Sulfat (Steber 1976)

Estergebundenes Sulfat wurde mit 4 n HCl bei 100°C in 4 h hydrolysiert.

2.6.2. Partialhydrolysen

2.6.2.1. Saure Partialhydrolyse

Um eine optimale Ausbeute an Peptiden zu erhalten, wurde eine Hydrolysekinetik (5-180 min.) mit 4n und 1n HCl aufgestellt. Als beste Hydrolysebedingungen erwiesen sich Hydrolysen von 30 - 45 min. mit 4n HCl.

2.6.2.2. Alkalische Partialhydrolyse

3mg ZW wurden in 0,5 ml Wasser suspendiert, 148 mg $Ca(OH)_2$ zugegeben und 24 h auf 100°C erhitzt. Anschließend wurde ein Tropfen Phenolphthalein zugegeben und CO_2 bis zu Farbumschlag eingeleitet. $Ca(CO_3)$ wurde abzentrifugiert und der Überstand chromatographiert.

Die Hydrolysekinetik (0,5; 3; 6;24 h) zeigte erst nach 24 h eine befriedigende Ausbeute an Peptiden.

2.6.2.3. Peptide

Die Partialhydrolyse der Peptide erfolgte in 5 - 15 min. mit 4 n HCl im kochenden Wasserbad.

2.6.2.4. N-Ac-Glucosaminnachweis (Sentandreu und Northcote 1968)

Die Zellwände wurden mit 0,1 n HCl 4 h bei 100°C hydrolysiert. Die acetylierten Aminozucker wurden dünnschichtchromatographisch (Laufmittel 2.7.1.b) mit dem Morgan-Elson-Reagenz nachgewiesen.

2.7. Chromatographische Verfahren

2.7.1. Papierchromatographie

1. Papiere:
   a) Whatman 1
   b) Whatman 3
   c) Schleicher und Schüll 2043 b gew.

2. Laufmittelgemische:
   a) Isopropanol/Eisessig/H_2O = 75/15/10 (v/v/v)
   b) α-Picolin/Ammoniak/H_2O = 70/2/28 (v/v/v)
   c) 88% Phenol/Eisessig/1m EDTA/H_2O = 840/10/1/160 (v/v/v/v)
   d) Butanol/Pyridin/Eisessig/H_2O = 60/40/3/30 (v/v/v/v)
   e) Pyridin/Äthylacetat/Eisessig/H_2O = 5/5/1/3 (v/v/v/v)
   f) Methanol/Pyridin/H_2O/10nHCl = 320/40/70/10 (v/v/v/v)

3. Verwendung:

Laufmittel a) und b) wurden zur Trennung von Aminosäuren und Aminozuckern und zur Isolierung von Peptiden verwendet. In den Gemischen c),d) und e) wurden die Zellwandzucker getrennt. Im Gemisch f) konnten Lysin und Ornithin nebeneinander nachgewiesen werden. Die Laufzeiten richteten sich im Einzelfall nach der zu trennenden Substanz. In der Regel wurden 2x 24 h chromatographiert. Es wurden 3-5 mg Zellwandhydrolysat je cm aufgetragen.

4. Entsalzung der Neutralzucker

Wegen des hohen Salzgehaltes war es häufig notwendig vor der Chromatographie zu entsalzen.

Entsalzung mit Aktivkohle:

100 mg Darco-Aktivkohle wurden in eine Pasteurpipette eingefüllt und mit 1 ml H_2O gespült. 3 mg Zellwandhydrolysat in 0,5 ml H_2O wurden aufgetragen, mit 0,5 ml H_2O gespült und die Zucker mit 1 ml 76% Äthanol eluiert.

Entsalzung mit Dowex:

300 mg Dowex-50-WX-8-Harz, H^+-Form, 50-100 mesh, wurden in 1 ml H_2O suspendiert und in eine Pasteurpipette gefüllt. Zweimal wurde das Harz in die Na^+-Form und wieder in die

H^+-Form überführt. Dazu wurden 2 ml 1 n NaOH über die Säule gegeben und mit H_2O gespült, bis der pH-Wert unter 8 gesunken war. Dann wurden 2 ml 1 n HCl über das Harz gegeben und mit H_2O gewaschen, bis der pH-Wert über 4,5 angestiegen war. Anschließend wurden 5 mg hydrolysierte Zellwände in 0,5 ml aufgetragen und mit 1 ml H_2O nachgespült. Das Eluat enthielt die Neutralzucker

2.7.2. Dünnschichtchromatographie

1. Dünnschichtplatten:
   a) Kieselgel G60 0,25 mm Schichtdicke (Merck)
   b) Cellulose, 0,10 mm Schichtdicke (Merck), 0,50 mm Schichtdicke (Schleicher & Schüll)
   Es wurden Glasplatten und Alu-Folien verwendet.

2. Laufmittelgemische:

   Cellulose

   a) Die Laufmittel für die Papierchromatographie wurden auch für die Dünnschichtchromatographie auf Cellulose verwendet.
   b) n-Propanol/NH_3conz./H_2O = 60/30/10 (v/v/v)
   c) 1,5 m Phosphatpuffer pH 6
   d) n-Propanol/0,2% NH_3conz. = 8/2 (v/v)
   e) Butanol, gesättigt mit 2 n NH_3

   Kieselgel

   f) Chloroform/Methanol/Eisessig = 95/5/1 (v/v/v)
   g) Benzol/Eisessig = 80/20 (v/v)
   h) Methanol/Chloroform/17% NH_3 = 40/40/20 (v/v/v)
   i) Methanol/Chloroform/Eisessig 40/40/20 (v/v/v)

3. Verwendung:
   Laufmittel b) diente zur Reinigung von Peptiden, besonders Lysin enthaltende Peptide wiesen günstige Rf-Werte auf. DNP-Derivate wurden in den Laufmitteln c), d), e), f) und g) getrennt. In System h) und i) wurden Aminosäuren und Aminozucker nachgewiesen.

2.7.3. Elektrophorese

Die elektrophoretische Trennung wurde auf DC-Cellulose bei 400 – 1000V/20 cm in 15-120 min. bei 4°C ausgeführt.

Puffer:

a) Eisessig/Ameisensäure/H_2O = 75/20,5/90,5 (v/v/v) pH 1,8
b) 0,1 m Propionsäure mit NH_3 conz. auf pH 10 eingestellt
c) Eisessig/Triäthylamin/H_2O = 7,5/21/971,5 (v/v/v) pH 9,6
d) Pyridin/Eisessig/H_2O = 6/23/971 (v/v/v) pH 4. (Ito und Strominger 1964)
e) 2 m Essigsäure in 0,6 m Ameisensäure pH 1,6
f) Pyridin/Eisessig/ H_2O = 10/4/86 (v/v/v) pH 5,3

Puffer c) diente zur Trennung Glutaminsäuremonohydraziden. Die restlichen Puffergemische eignen sich zur Trennung von Aminosäuren und Aminozuckern.

2.7.4. Aminosäureanalysator

2.7.4.1. Aminosäuren und Aminozucker

1. Beckman 120C

0,2 m Citratpuffer pH 3,24
0,7 m Citratpuffer pH 4,20
Pufferwechsel nach 100 min.
Temperatur: 10 min. 30°C
30°C bis 55°C in 45 min.
Harz: M 72 (Beckman)
oder M 82

2. Kontron, Liquimat III

Pico-Buffer II A 18 min.
Pico-Buffer II B 20 min.
Pico-Buffer II C 32 min.
Temperatur: 45°C 30 min.
56°C 25 min.
77°C 20 min.
Harz: Durrum DC 6
(Durrum Chem. Corp. Sunnyvale, California)

2.7.4.2. Peptide

Die Hydrolysekinetik der Peptide wurde mit Hilfe des Aminosäureanalysators verfolgt. Damit wurde auch die Reinheit der chromatographisch isolierten Peptide überprüft. Die α,γ-Glu-Glu und α,γ-Glu-Ala-Peptide wurden unter folgenden Sonderbedingungen getrennt:

Puffer A (0,2 m Na-Citratpuffer pH 3,0),
Puffer B (0,7 m Na-Citratpuffer pH 3,6).
Der Pufferwechsel erfolgte nach 60 min. Die Säulentemperatur betrug konstant 55°C.

2.7.5. Gelfiltration

Die Proben wurden auf Säulen mit Sephadex G 50 fine (3 x 75 cm), G 25 fine (3 x 125 cm), G 75 (2,5 x 75 cm) und G 15 (0,9 x 78 cm) aufgetrennt. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug bei G 75, G 50 und G 25 2ml/min. Es wurden 6 ml-Fraktionen aufgefangen. Bei G 15 wurde mit 10 ml/h eluiert und 0,6 ml-Fraktionen aufgefangen. Als Elutionsmittel diente 0,02 m Triäthylamin-Carbonat-Puffer pH 8,0. Das Elutionsprofil wurde durch Absorptionsmessung bei 206 nm (Uvicord III, LKB) bestimmt. Die vereinigten Fraktionen wurden im Rotationsverdampfer eingeengt.

2.7.6. Gaschromatographie

2.7.6.1. Neutralzucker

1. Acetylierung:
Die Neutralzucker wurden als Alditolacetate (Albersheim et al. 1967) nachgewiesen.

3 mg Zellwandhydrolysat wurde in 1 ml 0,5 n NH_4-Lösung aufgenommen. Es wurden 10 mg $NaBH_4$ zugegeben und 2 h bei Raumtemperatur reduziert. Überschüssiges $NaBH_4$ wurde mit Eisessig zerstört. Bei 40°C wurde abgeblasen, dann viermal in 1 ml Methanol aufgenommen und abgeblasen. Zum Rückstand wurde 1 ml Essigsäureanhydrid gegeben, das Röhrchen zugeschmolzen und 4 h bei 120°C acetyliert. Anschließend wurden die Alditolacetate mit Chloroform extrahiert. (Shaw und Moss 1969). Dazu wurde die Probe unter Eiskühlung mit 1,5 ml Pyridin und einigen Tropfen H_2O versetzt. Bei Raumtemperatur wurde solange abgeblasen und wieder in H_2O aufgenommen, bis kein Pyridingeruch mehr feststellbar war. Der Rückstand wurde in

1 ml H_2O aufgenommen und 2x mit 1 ml Chloroform extrahiert. Die Probe wurde abgeblasen und in einem Aliquot Chloroform gelöst.

2. Apparative Bedingungen:

Für die Untersuchungen wurde ein Hewlett-Packard Research Chromatograph Model 7620 A verwendet.

Temperatur:

a) Injektionsblock: 240°C
b) Flammenionisationsdetektor: 300°C
c) Säulentemperatur: 120°C 2 min. isotherm
120°C-180°C 8°C/min.
180°C 8 min. isotherm

Trägergas:

N_2 (30 ml/min.)

Brenngas:

H_2 (40 ml/min.)
Preßluft (400 ml/min.)

Säule:

Stahlsäule, 1,5 m x 1/8", 0,2% Diäthylenglycoladipatpolyester, 0,2% Diäthylenglycolsuccinatpolyester, 0,4% Silicon GE XF 1150 auf Gaschrom P, 100 - 200 mesh, (Serva)

Aufgetragene Menge:

1-5µg Zucker in 1-5µl, aufgetragen mit einer Hamilton-Mikrolitерspritze

Empfindlichkeit:

$32x10^2$

3. Auswertung:

Zur qualitativen Auswertung wurden Neutralzuckerstandards chromatographiert und die Retentionszeiten mit den Chromatogrammen der Zellwände verglichen. Quantitativ wurden die Hexosen enzymatisch bestimmt.

Der Rhamnosegehalt wurde durch kombinierte gaschromatographische und enzymatische Analyse bestimmt. Dazu wurde Glucose enzymatisch bestimmt. Dann wurde die Empfindlichkeit des Detektors für Rhamnose und Glucose ermittelt. Aus dem Vergleich der Peakfläschen der Glucose und der Rhamnose unter Berücksichtigung des Korrekturfaktors er-

gab sich der Rhamnosegehalt. Die Peakfläche wurde aus Höhe x Halbwertsbreite ermittelt.

2.7.6.2. Organische Säuren und Alkohole

Zum Nachweis organischer Säuren (C_2-C_5) und der entsprechenden Alkohole wurden saure Hydrolysate unbehandelt in den Gaschromatographen eingespritzt.

Apparative Bedingungen:

Säule: Stahlsäule, 1.80 m x 1/8", Chromsorb 101

Temperaturprogramm: 150°C 4 min. isotherm
150°C - 200°C 15°C/min.
200°C 8 min. isotherm

2.7.7. Sprühreagenzien

2.7.7.1. Ninhydrin für Aminoverbindungen

930 ml wassergesättigter Butanol
70 ml Eisessig
5 g Ninhydrin (Merck)

Entwickelt wurde für 10 min. bei 100°C.

2.7.7.2. Alkalisches Silbernitrat für Zucker (Trevelyan et al. 1950)

1. 5 ml gesättigte $AgNO_3$-Lsg. auf 1000 ml Aceton. Es wurde soviel H_2O zugegeben bis der Silbernitratniederschlag vollständig gelöst war.

2. 10 ml gesättigte NaOH-Lsg. in 400 ml Äthanol.

3. 10%ige Thiosulfatlsg.
Zuerst wurde mit Lsg. 1., dann mit Lsg. 2. gesprüht. Fixiert wurde in Lsg. 3.

2.7.7.3. Anilinphthalat für Zucker (Partridge 1949)

0,91 ml Anilin
1,66 g Phthalsäure
100 ml wassergesättigter Butanol

Neutralzucker wurden 5 - 10 min. bei 100°C entwickelt. Aminozucker konnten durch ihre Fluoreszenz im UV sichtbar oder durch kurzes Erhitzen der Chromatogramme auf 200°C nachgewiesen werden.

2.7.7.4. Morgan-Elson-Reagenz für N-Ac-Aminozucker (Sentandreu und Northcote 1968)

1. 0,1 m Boratpuffer pH 9,2

2. 4% Acetylaceton in 1,5 m Na_2CO_3

3. 1g p-Dimethylaminobenzaldehyd in einer Mischung von 30 ml Äthanol, 30 ml HClconz., 180 ml Butanol.
Die DC-Platte wurde mit Lsg.1. gesprüht und mit dem Föhn getrocknet. Nach Sprühen mit Lsg. 2. wurde 5 min. bei 100°C getrocknet. Dann wurde mit Lsg. 3. gesprüht und 5 min. bei 100°C entwickelt.

2.7.7.5. Schwefelsäure für organische Verbindungen

Kieselgelchromatogramme wurden mit 40% Schwefelsäure gesprüht und kurz auf 180°C erhitzt.

2.7.7.6. Cl_2/KJ-Reagenz für N-Acyl-Gruppen (Ryden und Smith 1952)

Die Chromatogramme wurden 10 min. Chlorgas ausgesetzt. Das Chlorgas wurde aus HCl mit $KMnO_4$ entwickelt. Die Chromatogramme wurden 30 min. gelüftet und anschließend mit einer wässrigen Lösung aus 1% Stärke und 1% KJ besprüht. CO-NH-Gruppierungen lassen sich als blaue Flecken nachweisen.

2.7.7.7. Salicylaldehyd für Hydrazide (Kawanishi et al. 1964)

Anstelle der Salicylsäure wurde Salicylaldehyd verwendet. Nach Sprühen der Chromatogramme mit 1% Salicylaldehyd in 90% Essigsäure wurden die Hydrazide durch ihre gelbe Fluoreszenz im UV_{350} nachgewiesen.

2.7.7.8. Schiff-Perjodat-Reagenz für α-Diol-Gruppen (Baddiley et al. 1956)

Lösungen:

1. 1% wässrige Perjodatlösung

2. 1% wässrige Fuchsinlösung, SO_2-Gas bis zum Umschlag nach gelb einperlen lassen.

Mit Lösung 1. wurde gesprüht, nach 5 min. mit SO_2 behandelt bis die Braunfärbung auf dem Chromatogramm verschwand. Dann wurde mit Lösung 2. gesprüht.

2.7.7.9. Hydroxylamin/Fe^{3+}-Reagenz für Lactone (Clotten und Clotten 1962)

1. 7 g Hydroxylamin-Hydrochlorid in 100 ml Methanol lösen und mit 100 ml einer 7,2%igen KOH-Lösung in Methanol mischen. Vom ausgefallenen KCl abfiltrieren.

2. 1 g $Fe^{3+}Cl_3$ in 100 ml 1% HCl lösen.

Mit Lösung 1. besprühen und 15 min. an der Luft trocknen. Dann mit Lösung 2. sprühen.

2.7.8. Vergleichssubstanzen

Aminosäuren:	D-u.L-Ala, D-u.L-Glu, D-u.L-Lys, D-u.L-Orn, D-u.L-Thr (Sigma), DNP-Aminosäuren (Serva)
Aminozucker:	D-GalN (Merck), D-ManN (Sigma), D-GlcN (Sigma), N-Ac-GlcN (Schuchardt), Mur (Sigma)
Neutralzucker:	D,L-Threitol (Sigma), m-Erythrit (Merck) Ara (Serva), Xyl (Fluka) Gal(Merck), Glc (Merck), Man (Merck), Rha(Roth)
Uronsäuren:	D-GalU (Fluka), D-GlcU (Fluka)
Hydrazide:	L-Glu-γ-Hydrazid (Sigma), L-Glu-a-Hydrazid (Hydrazinolyse von a-Glu-Ala)
Peptide:	Glu-Glu (Serva), γ-Glu-Glu (Sigma), Glu-Ala (Sigma), γ-Glu-Ala (Serva) α-Glu-Lys (Vega-Fox- Biocemicals) Lys-Glu (Serva)

2.8. Qualitative und quantitative Bestimmungsmethoden

Die quantitativen Bestimmungen wurden so durchgeführt, daß 0,5 Gew.-% erfaßt werden konnten.

2.8.1. Aminozucker

2.8.1.1. Morgan-Elson-Test (Reissig et al. 1955)

Reagenzien:

1. 0,1 m Boratpuffer pH 9,2

2. 10,5 g Dimethylaminobenzaldehyd in 87,5 ml Eisessig und 12,5 ml HCl conz. Lösen.
(Vor Gebrauch 1:10 mit Eisessig verdünnen).

Meßbereich: 0,01-0,1 µMol N-Acetyl-Amino-zucker

Durchführung: Wurden die Aminozucker aus Hydrolysaten bestimmt, so wurden sie vorher N-acetyliert (Wheat 1966).

Die Probe (0,02 - 5 µMol Aminozucker) wurde in 1 ml H_2O gelöst und mit 0,1 ml einer gesättigten $NaHCO_3$-Lösung und 0,1 ml einer 2%-igen Lösung von Essigsäureanhydrid in Aceton versetzt. Nach 5 min. wurde mit Eisessig angesäuert, kurz im kochenden Wasserbad erhitzt und abgeblasen.

Ein Aliquot der N-acetylierten Probe wurde in 0,5 ml H_2O gelöst, 0,1 ml Lösung 1. zugegeben und 3 min. auf 100°C erhitzt. Dann wurde mit Eiswasser abgekühlt und 3 ml Lösung 2. zupipettiert. Das Gemisch wurde 20 min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 578 nm bestimmt.

Auswertung: Eichkurve

2.8.1.2. Elson-Morgan-Test (Boas 1953, Johnson 1971)

Reagenzien: 1. 4% Acetylaceton in 1,5 m Na_2CO_3

2. 2,67% (w/v) p-Dimethylamino-benzaldehyd in einer Lösung von 96% Äthanol/HCl conz. = 1/1

Meßbereich: 0,01 - 0,22 µMol Aminozucker

Durchführung: Die Probe wurde in 1 ml H_2O gelöst und mit 1 ml Lösung 1. versetzt.

Dann wurde 30 min. in kochendem Wasser erhitzt. Es wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und nach 10 min. 5 ml 96% Äthanol zugemischt. 1 ml Lösung 2. wurde zugegeben und nach 30 min. die Extinktion bei 530 nm gemessen.

Auswertung: Eichkurve

2.8.2. Neutralzucker (Bergmeyer 1974)

2.8.2.1. Glucose und Mannose

Testansatz:
1ml Puffer pH 7,6
(0,05 m Triäthanolamin-Hydrochlorid,
0,007 m $MgCl_2 \times 6H_2O$,
0,0014 m Mercaptoäthanol)
0,05 ml ATP (10 mg/ml, Boehringer)
0,05 ml NADP (10 mg/ml, Boehringer)
0,20 ml Probe

E_1 bei 366 nm wurde bestimmt.

0,01 ml HK/ G-6P-DH (1 mg/ml, Boehringer)

E_2 wurde nach 10 min. abgelesen.

0,01 ml PGI (2 mg/ml, Boehringer)
0,01 ml PMI (2 mg/ml, Boehringer)

E_3 wurde nach Ablauf der Reaktion abgelesen. (Nach 5 min. Extinktionskonstanz)

Auswertung:
a) Glucosegehalt: $= E_2 - E_1$
b) Mannosegehalt: $= E_3 - E_2$

2.8.2.2. Galactose

Testansatz:
1ml Puffer pH 8,6
(0,1 m Tris/HCl, 0,01 m EDTA,
0,0014 m Mercaptoäthanol)
0,05 ml NAD (12 mg/ml)
0,20 ml Probe

E_1 bei 366 nm wurde bestimmt.

0,01 ml Gal-DH (1 mg/ml, Boehringer)
E_2 wurde nach Reaktionsablauf bestimmt.

Auswertung: Galactosegehalt: $= E_2 - E_1$

2.8.3. Gesamtzucker

2.8.3.1. Anthron-Test (Hopf, H. pers. Mitteilung)

Reagenz: 20 mg Anthron
100 ml 70% H_2SO_4

Meßbereich: 0,05 - 3 µMol Glucoseäquivalente

Durchführung: Die Probe wurde in 0,4 ml H_2O gelöst und mit 4 ml Anthronreagenz versetzt. Dann wurde 8 min. im kochenden Wasserbad erhitzt und abgekühlt. Die Extinktion wurde bei 623 nm bestimmt.

Auswertung: Eichkurve

2.8.3.2. Phenol-Test (Herbert et al. 1971)

Reagenz: 5% Phenol in H_2O (w/v)

Meßbereich: 0,11 - 0,55 µMol Glucoseäquivalente

Durchführung: Unhydrolysierte Zellwände wurden in 1 ml H_2O suspendiert und 1 ml Reagenz zugegeben. 5 ml H_2SO_4 conz. wurden auf die Oberfläche pipettiert und dann gemischt. Nach 10 min. wurde die Probe nochmals gemischt und 20 min. in ein Wasserbad von 30°C gestellt. Anschließend wurde die Extinktion bei 488 nm bestimmt.

Auswertung: Eichkurve

2.8.4. Uronsäuren (Blumenkrantz und Asboe-Hansen 1973)

Reagenzien: Lsg. 1. 0,0125 m Na-Tetraborat in H_2SO_4conz.
Lsg. 2. 0,15% m-Phenylphenol in 0,5% NaOH

Meßbereich: 0,003 - 0,078 µMol Glucuronsäure-äquivalente

Durchführung: Zellwand wurde in 0,1 ml H_2O suspendiert und mit 1,2 ml Lsg. 1. gemischt, in Eis gekühlt und 5 min. im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach Kühlung mit Eiswasser wurde 0,02 ml Lsg. 2. zugegeben und gemischt. Nach 10 min. wurde die Extinktion bei 520 nm bestimmt. Es wurde gegen eine Probe gemessen, die anstatt Lsg. 2. H_2O enthielt.

Auswertung: Eichkurve

2.8.5. Acetat (Bergmeyer 1974)

Reagenzien:

1. Puffer:
   0,1 m Triäthanolaminhydrochlorid
   0,02 m $MgCl_2 \times 6H_2O$
   pH 7,4

2. ATP-Lsg.:
   50 mg im 1 ml 5% $NaHCO_3$

3. 4 m Hydroxylamin-Hydrochlorid.
   (Vor Gebrauch mit 4 n NaOH neutralisieren).

4. 0,6 m TES

5. 0,06 m Fe^{III}-Chloridlösung (1,66 g $FeCl_3$ x 6 H_2O in 10 ml HCl conz. lösen, mit H_2O auf 100 ml auffüllen)

Meßbereich: 0,25-2 µMol Acetat

Testansatz:
0,50 ml Lsg. 1.
0,20 ml Lsg. 2.
0,20 ml Lsg. 3.
0,10 ml Probe
0,02 ml Acetatkinase (5 mg/ml, Boehringer)
30 min. bei 35°C inkubieren
1,00 ml Lsg. 4.
4,00 ml Lsg. 5.

Der Ansatz wurde gemischt, abzentrifugiert und die Extinktion bei 546 nm bestimmt.

Auswertung:

$$\mu\text{Mol Acetat} = \frac{\text{Extinktion der Probe}}{\text{Extinktion der Standards}}$$

2.8.6. Estergebundene Acylgruppen

2.8.6.1. Bestimmung mit Hydroxylamin (Hestrin 1949)

Die Messung wurde an unhydrolysierten Zellwandsuspensionen vorgenommen.

Reagenzien:
1. 2,00 m Hydroxylamin-Hydrochlorid-Lsg.
2. 3,5 n NaOH
3. 4 n HCl
4. 0,37 m $FeCl_3$ x $6H_2O$ in 0,1 n HCl

Meßbereich: 0,05 – 1 µMol Äthylacetatäquivalente

Durchführung: Zu 1 ml der Probe wurden 2 ml einer frischen 1:1 Mischung von Lsg. 1. und Lsg. 2. pipettiert. Nach einer Minute

wurden je 1 ml der Lösungen 3. und Lsg. 4. zugegeben. Nach Zentrifugation wurde die Extinktion bei 546 nm bestimmt. Die Werte wurden gegen eine Parallelprobe korrigiert, zu der die Reagenzien in der Reihenfolge 3., 1./2., 4. zugesetzt wurden.

Auswertung: Eichgerade

2.8.6.2. Bestimmung durch Ammonolyse (Baddiley und Davison 1961)

10 mg Zellwand wurden in einer Mischung von Ammoniak conz./Äthanol = 1/1 (v/v) suspendiert. 40 h wurde die Mischung bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Zellwände wurden anschließend abzentrifugiert und getrocknet.

Die Zellwände und der Überstand wurden untersucht. Die Methode eignet sich zum Nachweis esterartig gebundener Aminosäuren.

2.8.6.3. Bestimmung durch NaOH-Behandlung (Gottschalk et al. 1962)

3 mg Zellwände wurden in 1ml 0,2 N NaOH 10 min. bei 100°C erhitzt. Die Zellwände wurden abzentrifugiert, gewaschen und untersucht. Unter diesen Bedingungen werden esterartig gebundene Glycoproteine bereits gespalten.

2.8.7. Glycerin

Hydrazinreagenz:
1,5 g Glycin
5 ml 24% Hydrazin
0,2 ml 1 m $MgCl_2$
95 ml H_2O (pH mit 10 m KOH auf 9,8 eingestellt).

Testansatz:
800 µl Hydrazinreagenz
10 µl 0,02 m NAD
25 µl 0,01 m ATP
50 µl Probe

100 µl H_2O
E_1-Messung bei 366 nm
10 µl Glycerokinase (1mg/ml, Boehringer)
5 µl Glycerin-Phosphatdehydrogenase (5 mg/ml, Boehringer)
Inkubation bis 3 h bei RT
E_2-Messung

Auswertung: Glyceringehalt = E_2-E_1

2.8.8. Pyruvat

Testansatz: Probe (0,3 mg ZW-Hydrolysat)
3 ml 0,1 m Phosphatpuffer pH 7,5
0,2 ml NADH (2 mg/ml)
E_1-Messung bei 366 nm
0,01 ml L-LDH (1 mg/ml)
E_2-Messung (Nach Stillstand der Reaktion)

Auswertung: Pyruvatgehalt = E_2-E_1

2.8.9. Sulfat (Dodgston und Price 1962)

Reagenz: 2 g Gelatine (Merck) wurden in 400 ml H_2O von 70°C gelöst. Die Lösung wurde über Nacht bei 4°C aufbewahrt. 2 g $BaCl_2$ wurden zugegeben und 3 h gerührt. Anschließend wurde die Lösung 24 h in den Kühlschrank gestellt. Dann wurde so abzentrifugiert, daß der Überstand noch eine schwache Trübung zeigte. Im Überstand wurden 2 g $BaCl_2$ gelöst und der pH-Wert mit 2 n HCl auf 2,5 eingestellt.

Meßbereich: 0,01 - 0,20 µMol SO_4^{2-}

Testansatz: 0,5 ml Probe
1 ml Reagenz
E_1-Messung bei 366 nm gegen H_2O
E_2-Messung nach Zentrifugation

Auswertung: $E_{Probe} = E_1-(E_2+E_{Reagenz})$
Eichgerade

($E_{Reagenz} = E_1 - E_2$; Testansatz enthielt anstatt Probe 0,5 ml H_2O)

2.8.10. Phosphat (Chen et al. 1956)

Aufbereitung der Probe:	5 mg Zellwände wurden in 1 ml H_2SO_4 konz. suspendiert. Dann wurde erhitzt bis Nebelbildung auftrat und die Zellwände sich schwarz färbten. Wiederholt wurden 0,2 ml H_2O_2 zugegeben und erhitzt, bis eine klare Lösung entstand. Die Lösung wurde auf 15 ml mit H_2O aufgefüllt und ein Aliquot in den Test eingesetzt.
Reagenz:	10 ml 6 n H_2SO_4 20 ml H_2O 10 ml 2,5% Ammoniummolybtat (Merck) 10 ml 10% Ascorbinsäure (Merck)
Meßbereich:	0,02 – 0,26 µMol PO_4^{3-}
Durchführung:	Die Probe wurde in 4 ml H_2O gelöst und 4 ml Reagenz zugemischt. 2 h wurde bei 37°C inkubiert, dann die Extinktion bei 680 nm gemessen. Als Blindwert diente eine Probe, die H_2O für das Reagenz enthielt.
Auswertung:	Eichgeraden

2.8.11. Gesamtaminogruppen

Ninhydrinreagenz: (Aminosäureanalysator)	750 ml Äthylenglycolmonomethyläther 250 ml 4 m Acetatpuffer pH 5,5 20 g Ninhydrin 0,4 g $ZnCl_2$ Mischen und vor Gebrauch eine Nacht im Kühlschrank unter Stickstoff aufbewahren.
Meßbereich:	0,006–0,140 µMol Glutaminsäureäquivalente
Durchführung:	Die Probe, gelöst in 1 ml und 1 ml Reagenz wurden 15 min. im kochenden Wasserbad erhitzt und wieder gekühlt.

5 ml 96% Äthanol/Wasser = 1/1 wurden zugemischt und die Extinktion bei 578 nm bestimmt.

Auswertung: Eichkurve

2.8.12. Freie Aminogruppen

2.8.12.1. DNP-Aminosäuren für Standardzwecke (Bailey 1962; Salton 1961)

80 mg Aminosäuren wurden in 20 ml 2,5%iger Natriumbicarbonatlösung aufgenommen. Es wurden 0,07 ml FDNB, gelöst in 40 ml Äthanol, zugegeben und 30 min. bei 60°C inkubiert. Der Alkohol wurde abgeblasen und überschüssiges FDNB mit Äther im Verhältnis 1:1 ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde mit 2 ml 4 n HCl angesäuert.

Mono-DNP-Monoaminosäuren und Di-DNP-Diaminosäuren wurden mit Äthylacetat extrahiert. A oder ω-substituierte Mono-DNP-Diaminosäuren wurden mit Äthylacetat/Butanol = 1/1 (v/v) ausgeschüttelt.

2.8.12.2. DNP-Peptide (Ghuysen et al. 1968)

Etwa 0,1 µM Peptide wurden in 100 µl Puffer (Äthanol/Triäthylamin/H_2O = 8/1/1 (v/v) gelöst. 20 µl äthanolische FDNB-Lösung (20 µl/ml) wurden zugegeben und 30 min. auf 60°C erhitzt. Lagen mehr als eine Aminogruppe pro Peptid vor, so wurde die Inkubation wiederholt. Die Lösung wurde abgeblasen und hydrolysiert. Aus dem Hydrolysat wurden nach Verdünnung mit dem doppelten Volumen Wasser die DNP-Derivate extrahiert.

2.8.12.3. DNP-Zellwände (Takebe 1965)

20 mg Zellwände wurden in 5 ml H_2O suspendiert. Dann wurden 5 ml 2,5%ige $NaHCO_3$-Lösung und 20 ml 1,5%ige äthanolische FDNB-Lösung zugemischt. Der Ansatz wurde 14 h bei

37°C geschüttelt. Die dinitrophenylierten Zellwände wurden bei 20000 U/min. abzentrifugiert. Dann wurden sie jeweils mit 30 ml Äther, 96%igem Äthanol, 50%igem Äthanol und H_2O gewaschen und getrocknet.

2.8.12.4. Quantitative Bestimmung (Rao und Sober 1954)

Die dünnschichtgromatographisch getrennten DNP-Aminosäuren aus Hydrolysaten von dinitrophenylierten Zellwänden oder Peptiden wurden eluiert und die Extinktion bei 360 nm bestimmt. Das Elutionsgemisch hatte folgende Zusammensetzung:

100 ml Äthylalkohol,
100 ml H_2O und 0,54 ml NH_3konz.

Mit bekannten molaren Extinktionskoeffizienten konnte der Gehalt an DNP-Aminosäuren bestimmt werden. Die nicht dinitrophenylierbaren Aminosäuren wurden mit dem Analysator bestimmt.

2.8.13. Amidstickstoff (Ghuysen et al. 1967)

Während der Hydrolysekinetik der Zellwandkomponenten wurde der freigesetzte Ammoniak mit dem Analysator bestimmt. Amidiert Carboxylgruppen spalten leicht Ammoniak ab. Dieses macht sich in einem raschen NH_3-Anstieg während der ersten Stunde bemerkbar. Dagegen wird Ammoniak durch den Zerfall der Aminosäuren und Aminozucker nur langsam freigesetzt.

2.8.14. Bestimmung freier Carboxylgruppen durch Hydrazinolyse

2.8.14.1. Herstellung von wasserfreiem Hydrazin (Fraenkel-Conrat und Chun Ming Tsung 1967)

25 ml Hydrazin (Merck, 99%) wurde mit 250 ml Toluol und 250 g Calciumoxid versetzt und geschüttelt. Die Mischung wurde über Nacht stehen gelassen. Dann wurden 3 h unter

Rückflußkühlung gekocht und bei 91°C destilliert. Das Hydrazin wurde in 1-ml-Portionen in Fiolaxröhrchen eingeschmolzen und eingefroren.

2.8.14.2. Hydrazinolyse (Ghuysen et al. 1966)

0,4 µMol C-terminale Aminosäuren wurden pro Ansatz verwendet. 3 mg Zellwände wurden in ein Fiolaxröhrchen eingewogen, mit 0,3 ml Hydrazin versetzt und das Röhrchen zugeschmolzen. Die Inkubation erfolgte 48 h bei 80°C. Während dieser Zeit wurde das Gemisch mehrmals aufgeschüttelt. Dann wurde das Röhrchen aufgebrochen und das überschüssige Hydrazin im Exikator über Schwefelsäure abgezogen. Der Rückstand wurde in 0,3 ml Norleucinlösung (0,3 µMol/ml) aufgenommen und mit 0,05 ml destilliertem Benzaldehyd versetzt. Eine Stunde wurde geschüttelt und dann abzentrifugiert. Der Überstand wurde in derselben Weise nochmals mit Benzaldehyd extrahiert, 2 x mit 0,3 ml Äther gewaschen und abgeblasen. Als Standard dienten Zellwände von Micrococcus lysodeikticus.

Zum Nachweis der Hydrazide wurde der exikatorgetrocknete Rückstand in H_2O aufgenommen und elektrophoretisch getrennt. Glu-Monohydrazide wurden auch als Di-DNP-Derivate nachgewiesen.

Auswertung: Der Aminosäuregehalt wurde mit dem Analysator bestimmt und mit den Standards korrigiert.

2.8.14.3. Nachweis von Di-DNP-Glutaminsäure-Monohydraziden (Kawanishi et al. 1964)

Der trockene Hydrazinolyserückstand wurde in 1 ml H_2O gelöst und mit 100 mg $NaHCO_3$ und 2 ml 2,5% äthanolischer FDNB-Lösung versetzt.

Die Inkubation erfolgte 2 h bei RT. Die DNP-Derivate wurden extrahiert und zweidimensional auf DC-Cellulose in den Laufmitteln (e und c, 2.7.2.) getrennt. Nach Elution mit

1 n HCl wurde die Extinktion der Di-DNP-Glu-Monohydrazide bei 345 nm bestimmt. Mit Hilfe molarer Extinktionskoeffizienten wurde der Gehalt errechnet. Die Werte wurden gegen den ermittelten DNP-Gly-Gehalt aus Micrococcus lysodeikticus-Zellwänden nach Hydrazinolyse korrigiert.

2.8.15. Bestimmung freier Carboxylgruppen durch Reduktion

2.8.15.1. Veresterung mit Diazomethan (Chibnall und Rees 1951)

Eine Lösung von 0,5 g Diactin in 5 ml Äther wurde zu einer Lösung von 3 g KOH in 3 ml H_2O, die 3,5 ml Carbitol enthielt, vorsichtig zugetropft. Die alkalische Lösung hatte eine Temperatur von 70°C. Das entstehende Diazomethan wurde in eine eisgekühlte Lösung von 3 mg Probe, 2 ml 0,03 N 85% äthanolischer HCl eingeleitet, bis die gelbe Farbe für einige Minuten stabil blieb. Die Lösung wurde über Nacht in den Kühlschrank gestellt und dann mit Stickstoff abgeblasen.

2.8.15.2. Veresterung mit methanolischer HCl

1. Herstellung methanolischer HCl:
   200 ml Methanol wurden mit 1 g Magnesiumspänen 3 h unter Feuchtigkeitsausschluß am Rückfluß gekocht und destilliert. Dann wurde HCl-Gas durchgeperlt (Kantor und Schubert 1957). Das HCl-Gas wurde mit H_2SO_4 aus NaCl entwickelt und zur Trocknung durch H_2SO_4 geleitet. Die Normalität der methanolischen HCl-Lösung wurde durch Titration mit 0,1 n NaOH bestimmt.

2. Veresterung (Bailey 1962):
   3 mg Probe wurde mit 1 ml 0,1 n methanolischer HCl 24 h bei 30°C geschüttelt und im Vakuum getrocknet.

2.8.15.3. Veresterung mit Methanol/Acetanhydrid (Graßmann et al. 1955)

3 mg Probe wurde mit 4 ml Methanol und 0,75 ml Acetanhydrid 24 h bei 25°C geschüttelt. Dann wurde mit Stickstoff abgeblasen. Zum Rückstand 4 x 0,1 ml Methanol gegeben und wieder abgeblasen.

2.8.15.4. Reduktion mit $LiBH_4$

1. Reinigung des $LiBH_4$:
   5 g $LiBH_4$ wurden zur Reinigung mit 200 ml Äther extrahiert und das $LiBH_4$ aus der eingeengten Lösung auskristallisiert. Anschließend wurde im Exikator bei 50°C über $CaCl_2$ getrocknet.

2. Reduktion:
   10 mg veresterte Probe wurde mit 10 ml Tetrahydrofuran versetzt und 100 mg $LiBH_4$ zugesetzt. Es wurde 2 h bei 65°C inkubiert, bzw. 17h bei RT. Überschüssiges $LiBH_4$ wurde mit 1 n HCl zerstört. Polymeres Material wurde dialysiert, getrocknet und hydrolysiert.

2.8.15.5. Veresterung mit Methanol/Dowex H^+ (Reistadt 1974)

Nach N-Acetylierung und Trocknung wurde die aminuronsäurehaltige Probe in 2 ml Methanol aufgenommen und 50 mg methanolgewaschenes Dowex 50W H^+-Harz zugegeben. Dann wurde über Nacht auf 65°C erhitzt. Anschließend wurde filtriert und abgeblasen. Dann wurde 1 ml 0,01 m Boratpuffer pH 7,5 und 10 mg $NaBH_4$ zugegeben und bei Raumtemperatur über Nacht reduziert. Das überschüssige $NaBH_4$ wurde mit Eisessig zerstört. Dann wurde 4x mit Methanol abgeblasen. Anschließend wurde mit 4 n HCl 30 min. bei 100°C hydrolysiert.

2.8.16. Bestimmung freier Carboxylgruppen durch Photolyse (Perkins 1967)

DNP-Peptide wurden in 1% $NaHCO_3$-Lösung aufgenommen. Während der UV_{350}-Bestrahlung wurden in 5 min.-Abständen die

Extinktionen bei 348 nm und 284 nm bestimmt. Diese Methode eignet sich zur Bestimmung der Bindungsverhältnisse in Glu-Peptiden. Bei freier α-Carboxylgruppe der Glutaminsäure wird nach Decarboxylierung Dinitroanilin freigesetzt, das durch eine Extinktionszunahme bei 284 nm nachgewiesen wird. Gleichzeitig sinkt die Extinktion bei 348 nm. Zum Vergleich wurden α-DNP-Glu-Ala und γ-DNP-Glu-Ala parallel behandelt.

2.8.17. Reduzierende Gruppen (Kidby und Davidson 1973)

Der Test wurde modifiziert (Steber 1976)

Reagenz:	6,28 g K_3PO_4 x 7 H_2O 14,00 g K_2HPO_4 1,32 g $K_3Fe(CN)_6$ H_2O ad 1000 ml
Meßbereich:	0,01 - 0,16 µMol Glucoseäquivalente
Durchführung:	Zu 1 ml Probe wurden 0,25 ml Reagenz pipetiert und 5 min. im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlung wurden 9 ml H_2O zugegeben und die Extinktion bei 237 nm bestimmt.
Auswertung:	Eichgerade

2.8.18. Bestimmung freier C_1-Gruppen an Glucosaminpolymeren

5 mg Zellwände wurden in 1,5 ml H_2O suspendiert und mit 100 mg $NaBH_4$ versetzt. Dann wurde 4 Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Dialyse wurden die Zellwände getrocknet.

Lösliche Proben (0,1 µMol GlcN) wurden in 0,1 ml H_2O oder 0,1 m Boratpuffer pH 8,4 aufgenommen, 1 mg $NaBH_4$ zugegeben und 2 h reduziert. Überschüssiges $NaBH_4$ wurde mit Eisessig zerstört und mit Methanol entfernt.

Der Glucosamin- und Glucosaminitolgehalt wurden mit dem Analysator bestimmt.

2.8.19. Ascheanalyse

2.8.19.1. Aschegehalt

Die Zellwände wurden bei 105°C getrocknet. Die Porzellantiegel mit Deckel wurden bei 550°C im Muffelofen vorgeglüht. Dann wurden die Zellwände eingewogen und bei 550°C verascht. Getrocknet, vorgeglüht und verascht wurde jeweils bis zur Gewichtskonstanz. Die Wägung wurde auf einer Mettler-H54-Waage vorgenommen.

2.8.19.2. Kationen

Die Kationen wurden in der Bayerischen Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau bestimmt.

Der K^+- und Na^+-Gehalt wurde in einem Flammenemissionsspektrometer (Eppendorf) gemessen. Der Ca^{++}- und Mg^{++}-Gehalt wurde durch Atomabsorption bestimmt.

2.8.20. C,N,H -Elementaranalyse

Die Elementaranalyse wurde im Labor von Prof. Dr. W. Rüdiger (Lehrstuhl für Phytochemie) durchgeführt.

Die C-,N-,H-Analyse wurde mit einem Elemental analazer Mod. 1102 der Firma Carlo Erba durchgeführt. Die Substanz wurde in Silberkartuschen eingewogen und in einem Verbrennungsrohr das mit CuO gefüllt war, bei 1000°C in sauerstoffangereicherter Atmosphäre zu CO_2, H_2O und Stickoxyden verbrannt. Die Stickoxyde wurden mit Cu zu N_2 reduziert. Als Trägergas wurde Helium verwendet. Nach der Trennung in einer Porapak-Säule (Waters Associates Inc.) wurden CO_2, H_2O, N_2 mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor nachgewiesen. Die Auswertung erfolgte durch Vergleich der Peakflächen der Probe und Eichsubstanzen. (Modellverbindungen mit bekanntem C,N,H-Gehalt).

2.9. Perjodatbehandlung

Die Behandlung der Zellwände mit Natriumperjodat wurde unter folgenden Pufferbedingungen durchgeführt:

a) ungepuffert,
b) 0,1 m Acetatpuffer pH 5
c) 0,1 m Acetatpuffer pH 4,5

Die Perjodatkonzentration war 0,1 molar. Es wurden 5 mgZW/ml eingesetzt. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln bei 3°C für 24-40 h. Überschüssiges Perjodat wurde durch Zugabe von 0,05 ml Äthylenglycol/ml Inkubationslösung zerstört. Die Zellwände wurden abzentrifugiert und viermal mit H_2O gewaschen, gefriergetrocknet und das restliche Wasser bei 105°C über Nacht entfernt. Die Zellwände wurden hydrolysiert und auf den Analysator gegeben. Parallel wurde auch eine Probe mit N-Ac-Glucosamin behandelt.

Der Verlauf der Reaktion wurde durch Messung der Perjodatkonzentration spektoskopisch verfolgt. Dem Gemisch wurde zu verschiedenen Zeiten 20µl entnommen, mit 2 ml H_2O gemischt und die Extinktion in einer Quarzküvette bei 260 nm bestimmt. Mit Hilfe einer Eichgeraden konnte der Perjodatverbrauch errechnet werden. (Grado und Ballou 1961)

Lösliche Präparationen wurden in 0,1 m Acetatpuffer pH 5 mit 0,1 m Perjodat 24 h inkubiert. Anschließend wurde dialysiert oder nach Bleiacetatfällung direkt hydrolysiert.

Zur Reduktion (Spiro 1966) wurde die oxidierte Probe in 0,1 m Boratpuffer pH 8,4 gelöst und mit 0,1 m $NaBH_4$ für 3 h bei RT inkubiert. Dann wurde das überschüssige $NaBH_4$ mit Eisessig zerstört und 4 x mit 1 ml Methanol abgeblasen. Der Rückstand wurde mit 0,05 n H_2SO_4 1 h bei 80°C hydrolysiert, mit NH_3 neutralisiert und abgeblasen.

2.10. Bestimmung der anomeren Konfiguration

Zur Bestimmung der anomeren Konfiguration, wurde die optische Drehung einer Probe mit dem Zeiss-Kreispolarimeter 0,01° gemessen. Es wurden 200 mm Polarimeterröhrchen verwendet. Der Drehwinkel wurde nach folgender Formel errechnet:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha \times 100}{l \times c}$$

α = gemessener Drehwinkel (Mittelwert aus 5 Ablesungen)
l = Schichtdicke in dm
c = g Probe/100 ml

2.11. Ninhydrinabbau von Aminohexosen (Stoffyn 1959)

Die Probe wurde in 0,5 ml H_2O gelöst und mit Pyridin neutralisiert. Dann wurde 1 mg Ninhydrin zugegeben und für 30 min. bei 100°C erhitzt. Dann wurde abgeblasen und die entstandene Pentose gaschromatographisch oder dünnschichtchromatographisch nachgewiesen.

2.12. β- Elimination (Tipper 1968)

Im Alkalischen läßt sich Lactat aus Muraminsäure eliminieren. Bei ähnlichen Bindungsverhältnissen sollte auch eine β-Elimination z.B. mit ZW-Fraktionen (HF-Untereinheiten) auftreten.

Testansatz: Probe (enthält 0,12 µMol GlcN)
300 µl 4 m NH_3
Inkubation: a) 2h, RT b) 6h, 37°C

Dann wurde abgeblasen und hydrolysiert und der GlcN-Gehalt bestimmt.

2.13. Elektronenmikroskopie

Geringe Mengen einer Zellwandsuspension (1 mg/ml) wurden auf kohlebedampften Kollodiumfolien getrocknet. Anschließend wurden die Zellwände durch Bedampfung mit einer Platin/Iridiumlegierung kontrastiert.

Für Ultradünnschnitte wurden die Zellwände in Osmiumtetroxyd fixiert. (Ryter et al., 1958). Dann mit Uranylacetat kontrastiert. Die Einbettung erfolgte nach der Methode von Spurr (1969). Die Dünnschnitte wurden mit einem Ultratom III (LKB, Stockholm) hergestellt. Sie wurden im Elektronenmikroskop (EM 101, Siemens) untersucht.

3. ERGEBNISSE

3.1. Morphologie der Zellwandpolymere

3.1.1. Bacilloider Typ

Von 9 Species der Gattung Methanobacterium konnten durch Zerschlagen der Zellen mit Glasperlen (Schleifer und Kandler 1967b) und Nachreinigung mit Trypsin oder SDS unlösliche Zellwandpolymere isoliert werden. Die Ausbeute betrug 8 - 14%, berechnet auf gefriergetrocknete Zellen.

Abb.: 1. Isolierte Zellwandsacculi von M. formicicum

Die isolierten Zellwandsacculi zeigten die ursprünglichen Zellformen, wie es auch von den Mureinsacculi der Eubakterien bekannt ist (Weidel und Pelzer 1964). Die Gattung

Methanobacterium enthält stäbchenförmige bis kokkoide Formen (Zeikus und Bowen 1975a). Als Beispiel für einen stäbchenförmigen Vertreter zeigt Abb. 1 die Zellwandsacculi von Methanobacterium formicicum. Die Oberfläche ist strukturlos. Die Sacculi wurden nach Bedampfen mit einer Platin-Iridium-Legierung photographiert.

Abb.: 2.Ultradünnschnitt von isolierten Zellwandsacculi von M. formicicum

Wie aus Abb. 2 zu entnehmen ist, besteht der Sacculus aus einer Schicht von 10 - 15 nm Dicke. Er entspricht der elektronendichten Schicht, die als äußere Lage die Zellen umgibt (Zeikus und Bowen 1975a, Zeikus und Wolfe 1973). Er nimmt an der Septumbildung während der Zellteilung teil. Die Zellwand ist morphologisch vergleichbar mit der Zellwand gram-positiver Bakterien.

3.1.2. Kokkoider Typ

Abb. 3 zeigt die Zellwände von Methanobacterium ruminantium M1, einem Bakterium mit kokkoider Form. M. ruminantium hat einen dreischichtigen Zellwandaufbau mit einer Gesamtdicke von 15 nm (Langenberg 1968) bis 40 nm (Zeikus und Bowen 1975a). Nach Langenberg beträgt das Verhältnis der Schichtdicken von innen nach außen 1 : 5 : 1. Aus Zellen von M. ruminantium wurde eine einschichtige, elektronendichte Zellwand von 10 - 15 nm Dicke isoliert (Abb. 4) . Welcher der drei Schichten der isolierte Sacculus entspricht, konnte nicht mit Sicherheit entschieden werden. Der Dicke nach sollte er der mittleren Schicht entsprechen. Im Gegensatz dazu steht allerdings die geringere Elektronendichte der mittleren Schicht in Verhältnis zu der inneren und äußeren.

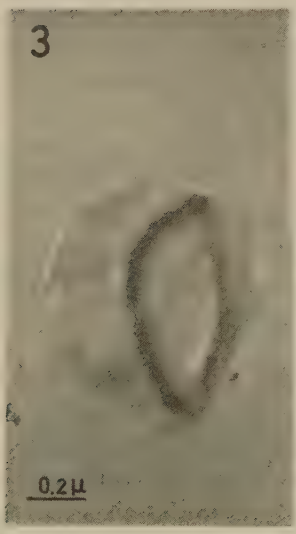
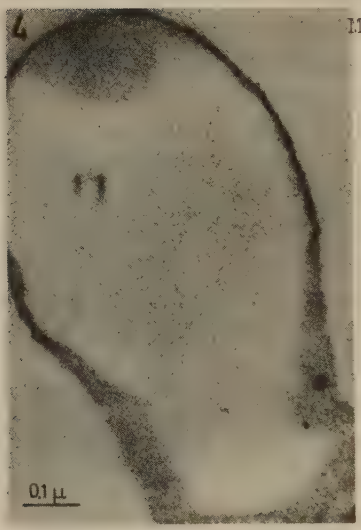


Abb.: 3. Isolierte Zellwandsacculi von M. ruminantium M1

Abb.: 4. Ultradünnschnitt von isolierten Zellwandsacculi von M. ruminantium M1



3.2. Chemische Zusammensetzung

3.2.1. C,N,H-Analyse

Species		C	N	H	ZW-Charge
M. formicicum	a.	45.73	6.56	6.82	Batch 1 tryp, EDTA
	b.	1.00	0.12	1.79	
M. spec. M.o.H.	a.	43.57	8.14	6.25	Batch 1 tryp
	b.	1.00	0.16	1.72	
M. ruminantium M1	a.	36.03	6.82	5.47	Batch 1 tryp
	b.	1.00	0.16	1.82	
M. ruminantium M1	a.	39.63	7.64	5.74	Batch 2 tryp, EDTA
	b.	1.00	0.17	1.74	

M. thermoautotrophicum	a.	42.43	9.56	6.09	Batch 3 SDS
	b.	1.00	0.19	1.72	
M. thermoautotrophicum	a.	38.35	8.50	5.57	Batch 3 tryp
	b.	1.00	0.19	1.74	

Tabelle 1. C,N,H-Zusammensetzung

a. = % Trockengewicht
b. = Molverhältnisse

Das durchschnittliche C/N-Verhältnis beträgt bei Proteinen 5.00-8.33. Die Zellwandpolymere der Gattung Methanobacterium haben ein durchschnittliches Verhältnis von 5.74, wie aus Tab. 1 zu entnehmen ist. Das zeigt an,daß das Polymer einen hohen Anteil an Aminoverbindungen aufweist. Der Anteil der Aminogruppen ist bei M. thermoautotrophicum (C/N = 5.20) noch höher als bei Methanospirillum hungatii (C/N = 5.88), das eine reine Proteinscheide besitzt (Kandler und König 1978). Methanosarcina barkeri, die ein Heteropolysaccharid besitzt (Kandler und Hippe 1977), hat zum Vergleich ein C/N-Verhältnis von 10. Die Summe von C, N und H ergeben bei Methanobacterium 48 - 56 Gew.-%. Es kann angenommen werden, daß der gefundene Stickstoff in Form von Aminogruppen vorliegt.

3.2.2. Aminosäuren und Aminozucker

3.2.2.1. Aminosäuren und Aminozucker der Zellwandsacculi von M. thermoautotrophicum

Grundsätzliches über die Aminosäure- und Aminozuckerzusammensetzung der Zellwandsacculi von Methanobacerium soll am Beispiel von M. thermoautotrophicum besprochen werden. Die Analyse der isolierten Zellwandsacculi ergab, 3 Aminosäuren und 1 Aminozucker (Tabelle 2).

Species		Aminosäuren				Aminozucker		ZW-Char
		Ala	Glu	Lys	NH_3	GalN	GlcN	
M. arbophilicum	a.	0.73	1.02	0.48	0.56	0.32	-	Batch 1
	b.	1.52	2.13	1.00	1.16	0.67		tryp
M. spec. AZ	a.	0.28	0.51	0.22	0.29	0.20	-	Batch 1
	b.	1.27	2.32	1.00	1.32	0.91		tryp,SD
M. formicicum	a.	0.56	0.78	0.37	0.56	0.37	0.43	Batch 1
	b.	1.51	2.11	1.00	1.51	1.00	1.16	tryp
M. formicicum	a.	0.44	0.64	0.31	0.56	0.28	0.36	Batch 1
	b.	1.42	2.06	1.00	1.81	0.90	1.16	tryp,ED
M. spec. M.o.H.	a.	0.61	1.05	0.44	0.49	0.20	0.55	Batch 1
	b.	1.39	2.39	1.00	1.12	0.45	1.25	tryp
M. spec. M.o.H. -G	a.	0.25	0.42	0.19	0.16	-	0.16	Batch 1
	b.	1.32	2.21	1.00	0.84		0.84	tryp
M. ruminantium M1	a.	0.38[1]	0.78	0.42	0.36	0.34	0.25	Batch 1
	b.	0.90	1.85	1.00	0.85	0.80	0.60	tryp
M. ruminantium M1	a.	0.44[2]	0.72	0.40	0.40	0.32	0.20	Batch 3
	b.	1.10	1.80	1.00	1.00	0.80	0.50	tryp
M. ruminantium PS	a.	0.61	1.14	0.70[3]	0.44	0.19	0.20	Batch 1
	b.	0.87	1.63	1.00	0.63	0.27	0.29	tryp
M. ruminantium PS	a.	0.68	1.36	0.80[4]	0.52	0.28	0.32	Batch 2
	b.	0.85	1.70	1.00	0.65	0.35	0.40	tryp
M. thermoauto-trophicum	a.	0.69	1.35	0.57	0.26	0.09	0.69	Batch 1
	b.	1.21	2.37	1.00	0.45	0.15	1.21	tryp
M. thermoauto-trophicum	a.	0.90	1.63	0.75	0.50	+	0.87	Batch 2
	b.	1.20	2.17	1.00	0.67		1.16	tryp,SD
M. thermoauto-trophicum	a.	0.61	1.09	0.49	0.36	+	0.62	Batch 2
	b.	1.24	2.22	1.00	0.73		1.27	tryp
M. thermoauto-trophicum	a.	0.71	1.36	0.61	0.39	+	0.68	Batch 3
	b.	1.16	2.23	1.00	0.64		1.11	tryp
M. thermoauto-trophicum	a.	0.99	1.49	0.69	0.44	+	0.96	Batch 3
	b.	1.43	2.16	1.00	0.64		1.39	SDS
M. thermoauto-trophicum[5]	a.	0.83	1.49	0.63	0.49	0.55	0.15	Batch 1
	b.	1.32	2.37	1.00	0.77	0.87	0.23	tryp
M. spec.	a.	0.36	0.74	0.33	0.17	0.34	0.18	Batch1
	b.	1.09	2.24	1.00	0.51	1.03	0.55	SDS

Tabelle 2. Aminosäure- und Aminozuckerzusammensetzung der Zellwandsacculi

a. = µMol/mg
b. = Molverhältnisse
- = nicht vorhanden
+ = in Spuren
1) = Thr
2) = enthält 0.16 µMol Thr
3) = enthält 0.19 µMol Orn
4) = enthält 0.16 µMol Orn
5) = Stamm Marburg

Die Aminosäuren Alanin, Glutaminsäure und Lysin ergaben ein Verhältnis von 1.20 : 2.27 : 1.00. Es ergaben sich keine geradzahligen Molverhältnisse, sondern Alanin und Glutaminsäure kommen verglichen mit Lysin im Überschuß vor. Die Aminosäuren besitzen alle die L-Konfiguration, wie durch Inkubation mit D-Aminosäureoxidase, L-Aminosäuredecarboxylasen und L-Aminosäureacylase gezeigt wurde. Die Molverhältnisse der tryptisch oder mit SDS gereinigten Sacculi unterscheiden sich nicht wesentlich. Bei der tryptischen Inkubation werden somit keine Aminosäuren abgespalten.

M. thermoautotrophicum besitzt neben geringen Spuren von Galactosamin als Aminozucker Glucosamin in der Zellwand. Durch den Nachweis von Glucosamin-6-Phosphat nach Inkubation von Zellwandhydrolysaten mit Hexokinase wurde für Glucosamin die D-Konfiguration ermittelt. (R_{NH_3} = 0.07). Glucosamin kommt etwa in der gleichen Menge wie Alanin vor.

Es ist bekannt, daß Aminozuckerpolymere mit unsubstituierten Aminogruppen relativ hydrolysestabil sind (Perkins 1963) und möglicherweise nicht quantitativ erfaßt werden. Daher wurde die Zellwand peracetyliert und hydrolysiert. Aber es wurde keine Zunahme an Glucosamin beobachtet (Tabelle 3). Daher ist anzunehmen, daß die Aminozucker quantitativ erfaßt wurden.

METHANOBACTERIUM		Ala	Glu	Lys	GlcN	NH_3	ZW-Charge
thermoautotrophicum	a.	1.05	1.86	0.91	0.86	0.32	Batch 3
	b.	1.15	2.04	1.00	0.95	0.35	SDS

Tabelle 3. Zusammensetzung des Zellwandhydrolysates nach Peracetylierung

Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse der Acetatbestimmung. Es wurde etwa die doppelte Menge Acetat wie Glucosamin gefunden. Auch wurde gaschromatographisch Acetat als einzige niedere Säure nachgewiesen. Daher kann der hohe Acetatbetrag nicht auf eine Fremdaktivität (evtl. Propionsäure) der Acetatkinase zurückgeführt werden. Aus dem negativen Test auf

O-Acylgruppen ist zu schließen, daß das gesamte Acetat an Aminogruppen gebunden ist. Ein indirekter Hinweis auf eine N-Substitution des GlcN war dadurch gegeben, daß GlcN nicht mit Perjodat oxidierbar und nicht dinitrophenylierbar war. Nach milder Hydrolyse konnte N-Acetyl-Glucosamin dünnschichtchromatographisch isoliert und direkt mit dem Elson-Morgan-Sprühreagenz nachgewiesen werden. Acetat tritt somit als N-Substituent von GlcN auf. Die Position der überschüssigen Acetylgruppen konnte nicht direkt bestimmt werden.

Species	Aminozucker (µMol/mg)	Acetat (µMol/mg)	ZW-Charge
M. formicicum	0.64	1.23	Batch 1 tryp, EDTA
M. spec. M.o.H.	0.75	2.09	Batch 1 tryp,
M. ruminantium M1	0.60	1.84	Batch 1 tryp
M. ruminantium M1	0.73	1.75	Batch 2 tryp, EDTA
M. thermoautotrophicum	0.87	1.90	Batch 2 tryp, SDS
M. thermoautotrophicum	0.68	1.87	Batch 3 tryp
M. thermoautotrophicum	0.96	1.84 1.94 1)	Batch 3 SDS
M. thermoautotrophicum	0.70	1.23	Batch 1 tryp (Stamm Marbg.)

Tabelle 4. Bestimmung des Acetatgehalts

1) = Bestimmung nach 16 h Hydrolyse

3.2.2.2. Aminosäuren und Aminozucker der Zellwandsacculi der übrigen untersuchten Stämme

Auch die Sacculi der weiteren 9 untersuchten Stämme von Methanobacterium besitzen einen Satz aus 3 bzw. 4 Aminosäuren und 1 oder 2 Aminozuckern (Tabelle 2), auch das Molverhältnis von Alanin, Glutaminsäure und Lysin ist mit 1.09 - 1.52 : 2.06 - 2.37 : 1.00 in ähnlichen Bereichen wie bei M. thermoautotrophicum. Ein Austausch von Alanin und Lysin gegen Threonin bzw. Ornithin kommt bei den Arten M. ruminantium M1 und M. ruminantium PS vor. Bei M. ruminantium M1 ersetzt Threonin ganz oder teilweise Alanin. Ornithin neben Lysin kommt bei M. ruminantium PS vor.

Die Aminozucker Glucosamin und Galactosamin können einzeln oder auch zusammen vorkommen. M. spec. M.o.H.-G besitzt wie M. thermoautotrophicum praktisch nur GlcN.

Ebenfalls nur einen Aminozucker besitzen auch M. arbophilicum und M. St. AZ, im Gegensatz zu M. thermoautotrophicum jedoch nicht Glucosamin sondern Galactosamin. Bei allen anderen Stämmen, einschließlich M. thermoautotrophicum Stamm Marburg, kommen beide Aminozucker vor.

Glucosamin läßt sich bei M. ruminantium M1 mit 70% HF (0°C, 3 h) abspalten oder durch Perjodat zerstören. Das deutet darauf hin, daß GalN wie bei M. arbophilicum und M. spec. AZ die Position von GlcN im Glycanstrang einnimmt. GlcN sollte dagegen als Einzelsubstituent oder als 1,6-verknüpftes Oligosaccharid in Phosphdiesterbindungen vorliegen, denn es wurden zusätzlich über 4% Phosphat gefunden. Die restlichen Stämme, die ebenfalls 2 Aminozucker aufweisen, zeigen diese Eigenschaften nicht. Daher bedarf es noch weiterer Untersuchungen, um zu entscheiden, ob es sich in diesen Fällen um ein Mischpolymer aus GalN und GlcN oder um verschiedene Glycanstränge mit jeweils nur einem der beiden Aminozucker handelt. Sicherlich hat M. formicicum zusätzliche Glycanketten, denn die Aminozuckermenge liegt nicht

in der Größenordnung von Lysin, sondern ist doppelt so hoch.

3.2.3. Talosaminuronsäure

Folgende Beobachtungen sprachen für das Vorhandensein mindestens einer weiteren Verbindung im Zellwandpolymer zusätzlich zu den anfangs gefundenen Substanzen (Aminozucker, Aminosäuren, Neutralzucker):

1. Peaks auf Chromatogrammen des Aminosäureanalysators oder Flecke auf zweidimensionalen Papierchromatogrammen, von Partialhydrolysaten, deren Zusammensetzung durch die Peptidanalyse (3.3.2.) nicht aufgeklärt werden konnte.

2. Die Summierung der gefundenen Bestandteile, einschließlich Neutralzuckern und Asche, ergab nur ca. 70 - 80% des Gesamtgewichtes der eingesetzten Zellwand (3.2.7.).

3. Die Stickstoffmenge, ermittelt durch die Elementaranalyse, ergab höhere Werte als die Summe der Aminogruppen der gefundenen Verbindungen (Tabelle 5).

4. Die doppelte Menge Acetat wie Glucosamin und der negative Test auf O-Acyl-Gruppen sprachen für eine weitere N-acetylierte Verbindung.

Species	I	II	ZW-Charge
M. spec. M.o.H.	3.78	5.81	Batch 1 tryp
M. formicicum	3.44	4.69	Batch 1 tryp
M. thermoautotrophicum	4.36	6.07	Batch 3 tryp

Tabelle 5. Gesamtaminogruppen (µMol/mg)
I = Aminosäureanalysator (Lys mit 2 NH_2-Gruppen gerechnet)
II = N aus der Elementaranalyse (als NH_2 gerechnet)

3.2.3.1. Isolierung und vorläufige Charakterisierung

Auf Papierchromatogrammen von Zellwandpartialhydrolysaten (4 n HCl, 30 min, kochendes Wasserbad) zeigte sich nach Chromatographie im Laufmittelsystem 2.7.1.b. eine ninhydrinpositive Bande zwischen Laufmittelfront und GlcN. Die Bande wurde eluiert. Nach Inkubation mit 1 m NH_3 (2-16 h) bei RT und erneuter Chromatographie in dem gleichen System wurde nun eine kürzer laufende, ninhydrinpositive Bande mit einem R_{Ala}-Wert von ca. 1 gefunden. Die Bande wurde mit 0,01 n HCl eluiert, mit Aktivkohle entfärbt und gefriergetrocknet. Durch das veränderte chromatographische Verhalten nach NH_3-Behandlung war eine Abtrennung von den Neutralzuckern und N-acetylierten Aminozuckern möglich.

Eine positive Reaktion mit Ninhydrin, alkalischem Silbernitrat und Anilinphthalat zeigte an, daß die Verbindung eine Aminogruppe, reduzierende Gruppen und eine Aldehydfunktion besaß. Nach Ninhydrinbehandlung bei 100°C wurde die für Hexosaminuronsäuren charakteristische Verfärbung von braun nach violett beobachtet (Perkins 1963).

Die Bande zwischen GlcN und Laufmittelfront zeigte nach Besprühen mit dem Hydroxylamin/Fe^{3+}-Reagenz eine Gelbfärbung. Sie trat nach NH_3-Behandlung nicht mehr auf. Nach diesen Befunden wurde vermutet, daß es sich bei der unbekannten Substanz um eine Hexosaminuronsäure handelte, zumal die kürzer laufende Bande durch Erhitzen mit HCl (1 n HCl, 15 - 30 min.) wieder teilweise in die schnellerlaufende überführt, d.h. lactonisiert werden konnte. Die Reinheit der Probe wurde mit dem Aminosäureanalysator überprüft. Dazu wurden die Banden nach Elution direkt und nach anschließender Hydrolyse (1 n HCl, 30 min.) chromatographiert. Nach Hydrolyse wurde qualitativ keine Veränderung der Peaks gefunden. Allerdings wurde eine Hydrolyselabilität festgestellt. Nach 16 h Hydrolyse der isolierten Substanz war auf Analysatorchromatogrammen nur noch ein vergrößerter Ammoniakpeak zu sehen. Eine Gehaltsbestimmung nach verschiedenen Hydrolysezeiten der Zellwand zeigt Tabelle 6.

t (min)	µMol/mg ZW (Konstante : 40) [1)]
5	-
10	0.07
20	0.14
30	0.21
45	0.27
120	0.13
180	0.09
240	-

Tabelle 6. Hydrolysekinetik der "TalNU"(Lacton)

- = in Spuren
1)= Steber, Dissertation

Nach 4 h Hydrolyse mit 4 n HCl ist fast kein Peak mehr nachweisbar. Auch dieses Ergebnis stimmt mit dem beschriebenen Verhalten von Hexosaminuronsäuren bei sauren Hydrolysebedingungen überein (Perkins 1963).

Diese Tatsache erklärt auch die Beobachtung, daß der mit dem Elson-Morgan-Test gemessene Aminozuckergehalt, der Gesamt- und Partialhydrolysate nicht mehr als 10% über dem Glucosamingehalt liegt, der mit dem Analysator bei M. thermoautotrophicum bestimmt wurde. (Tabelle 7).

Species	Hydrolyse (h)	Aminozucker (µMol/mg)	ZW-Charge
M. ruminantium M1	4.0	0.65	Batch 3 tryp
M. spec. M.o.H.	4.0	0.74	Batch 1 tryp
M. thermoautotrophicum	0.5	1.08	Batch 3 SDS
	1.0	1.07	
	4.0	1.13	
	8.0	1.08	
	16.0	0.99	

Tabelle 7. Aminozuckerzusammensetzung (Elson-Morgan-Test)

Nachdem auch die Dünnschichtchromatographie der unhydrolysierten Probe in verschiedenen Laufmitteln (Tabelle 8) nach Besprühen mit Ninhydrin und Anilinphthalat nur einen Fleck ergab, wurde die Substanz als rein angesehen.

Laufmittelsystem	R_f-Werte	
	Säure	Lacton
2.7.1.b.	0.33	0.78
2.7.1.d.	0.18	0.41
2.7.1.e.	0.26	0.49

Tabelle 8. Dünnschichtchromatographisches Verhalten der "TalNU"

Das elektrophoretische Verhalten der unbekannten Substanz zeigte, daß sie eine Carboxylgruppe enthielt, denn die kathodische Mobilität nahm im Verhältnis zu GlcN mit

steigendem pH-Wert ab (Tabelle 9).

Puffersystem	pH	V/cm	t (min)	R_{GlcN}-Werte Säure	Lacton
2.7.3.a.	1.8	50	30	0.84	1.06
2.7.3.f.	5.4.	25	30	0.66	0.84
2.7.3.b.	10.0	25	30	0.51	o

Tabelle 9. Elektrophoretisches Verhalten der "TalNU"
o = nicht bestimmt

3.2.3.2. Endgültige Identifizierung

Die Hexoaminstruktur wurde durch den Elson-Morgan-Test belegt. Ein positiver Test zeigte eine reduzierende Gruppe am C_1 und eine freie Aminogruppe am C_2 an. Das gemessene Absorptionsmaximum von 530 nm deutete auf unsubstituierte OH-Gruppe am C_3 hin. Bei einer Substitution verschiebt sich das Maximum nach 510 nm (Horton 1969). Auch der Versuch einer β-Elimination verlief negativ. Weder wurde eine Absorption bei 230 nm, noch eine wesentliche Abnahme der Substanz beobachtet. Ein weiterer Hinweis für eine freie OH-Gruppe am C-Atom 3 (Tipper 1968).

Um die Hexosaminstruktur zu klären, wurde die Substanz nach N-Acetylierung und Carboxylreduktion (Reistadt 1974) dem Ninhydrinabbau unterworfen (Stoffyn 1959). Die gebildete Pentose wurde als Alditolacetat gaschromatographisch nachgewiesen. Es wurde ein Peak erhalten, der mit Lyxose und Arabinose cochromatographierte, sich aber von Ribose und Xylose abtrennte.

Die beiden Zucker wurden dünnschichtchromatographisch im Laufmittelsystem 2.7.1.e. getrennt. Es wurde ein Fleck erhalten, der mit Lyxose chromatographierte. Dadurch blieben als mögliche Strukturen nur das Anomerenpaar GalNU und TalNU übrig. GalNU konnte durch Co-Chromatographie mit authentischer Substanz auf dem Aminosäureanalysator und wegen

der bei GalNU fehlenden Lactonbildung ausgeschlossen werden. GalNU wurde von Mayer, Freiburg, zur Verfügung gestellt, GulNU wurde aus der Zellwand von Halococcus morrhuae isoliert. Ebenso konnten auf Grund ihres chromatographischen Verhaltens (Aminosäureanalysator) alle bisher bekannten Hexosaminuronsäuren ausgeschlossen werden (Mayer, Freiburg). Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengestellt.

	A	B	C	D
Mur	58'	60'	o	15' 18''
GlcN	133'	180'	46' 48"	52' 30''
AltNU	o	76'	o	o
GlcNU	o	82'	o	23' 33''
ManNU	o	88'	o	26' 30''
GalNU	128'	123'	41' 42"	39' 07''
GulNU	131'	131'	44' 33"	41' 41''
"TalNU"	128'	o	43' 12"	42' 21''
	169' (Lacton)		55' 31" (Lacton)	

Tabelle 10. Elutionszeiten der "TalNU", verschiedener Hexosaminuronsäuren, Muraminsäure und Glucosamin auf verschiedenen Aminosäureanalysatoren.
A = Beckman 120 C
B = Beckman 120 B (Mayer, Freiburg)
C = Liquimat III, Kontron
D = Durrum D-500 (Mayer, Freiburg)
o = nicht bestimmt

Es wird angenommen, daß die TalNU im Polymer N-acetyliert vorliegt. Das geht daraus hervor, daß die TalNU in Partialhydrolysaten nach Perjodatbehandlung oder Dinitrophenylierung der ZW oder des Glycanstranges (3.3.3.) nicht abnimmt. N-Ac-TalNU konnte allerdings nicht direkt nachgewiesen werden. Das hängt möglicherweise mit der Hydrolyselabilität der N-Acetyl-Gruppe zusammen (Perkins 1963).

3.2.4. Neutralzucker

Neutralzucker wurden in unterschiedlichen Mengen bei allen Vertretern von Methanobacterium nachgewiesen. Die Zucker wurden enzymatisch, papierchromatographisch oder gaschromatographisch als Alditolacetate nachgewiesen. Gewichtsanteile über 10% werden nur von M. spec. M.o.H. und M. formicicum erreicht. Bei M. arbophilicum liegen die Werte dagegen unter 1%. Eine Übersicht gibt Tabelle 11.

Species	Neutralzucker				ZW-Charge
	Gal	Glc	Man	Rha	
M. arbophilicum	-	-	0.01	0.01	Batch 1 tryp
M. formicicum	0.28	0.10	0.13	0.23	Batch 1 tryp
M. spec. M.o.H.	0.37	0.04	0.52	+	Batch 1 tryp
M. spec. M.o.H.-G	0.10	0.05	0.05	+	Batch 1 tryp
M. ruminantium M1	0.12	0.01	0.01	0.09	Batch 1 tryp
M. ruminantium M1	0.16	0.12	-	o	Batch 3 tryp
M. ruminantium PS	0.07	0.09	-	0.06	Batch 2 tryp
M. thermoautotrophicum	0.01	0.07	-	+	Batch 1 tryp

Tabelle 11. Neutralzuckerzusammensetzung (µMol/mg ZW)
+ = in Spuren vorhanden
- = nicht vorhanden
o = nicht bestimmt

Es handelt sich um Neutralzuckerpolysaccharide, da eine Prüfung auf Uronsäuren bei M. thermoautotrophicum, M. rumi-

nantium M1 und M. spec. M.o.H. negativ verlief.

Sie sind teilweise extrahierbar (3.3.1.) und sind keine Strukturkomponenten des Zellwandsacculus, denn es tritt keine Zerstörung des Sacculus nach Extraktion der Neutralzucker ein.

Es wurden nur Hexosen nachgewiesen: Galactose, Glucose, Mannose und Rhamnose. Die Reaktion mit Galactosedehydrogenase und Hexokinase zeigt, daß Galactose, Glucose und Mannose in der D-Konfiguration vorliegen.

Triosen, Tetrosen oder Pentosen wurden nicht gefunden.

Auch der Gesamtzuckergehalt von 0.12 µMol/mg (Batch 2, tryp) und 0.11 µMol/mg (Batch 2, tryp, SDS) von M. thermoautotrophicum, bestimmt mit der Phenolmethode, übersteigt nicht wesentlich die Summe der in Tabelle 11 erfaßten Komponenten.

3.2.5. Sulfat und Phosphat

Der Sulfatgehalt der untersuchten Arten beträgt nicht mehr als 1%. Man kann daher annehmen, daß keine sulfatisierten Polymere vorliegen. (Tabelle 12) .

Species	SO_4^{2-}	PO_4^{3-}	ZW-Charge
M. arbophilicum	+	4.54	Batch 1 tryp
M. formicicum	+	0.64	Batch 1 tryp, EDTA
M. spec. M.o.H.	0.37	0.20	Batch 1 tryp
M. ruminantium M1	0.08	4.65	Batch 1 tryp
M. ruminantium M1	o	3.90	Batch 3 tryp
M. ruminantium PS	o	1.00	Batch 2 tryp
M. thermoautotrophicum	0.10	0.28	Batch 3 tryp

Tabelle 12. Sulfat- und Phosphatgehalt (Gew.-%)
+ = in Spuren
o = nicht bestimmt

Bis auf 2 Ausnahmen steigt auch der Phosphatgehalt nicht über 1%. Nur bei M. arbophilicum und M. ruminantium M1 wurden ca. 4% gefunden. Da bei M. ruminantium M1 GlcN mit 70% HF (0°C, 3 h) abgespalten werden kann, sollte GlcN über eine Phosphodiesterbindung verknüpft sein.

Da M. arbophilicum keinen zweiten Aminozucker besitzt, ist dort der Glycanstrang des Sacculus möglicherweise nur mit Phosphat substituiert.

Hinweise auf das Vorkommen von Teichonsäuren waren nicht gegeben, da kein Glycerin oder Ribitol nachgewiesen werden konnte.

3.2.6. Ascheanalyse

Der Aschegehalt schwankt zwischen 8% und 15% (Tabelle 13).

Species	Aschegehalt	ZW-Charge
M. formicicum	8.30	Batch 1 tryp, EDTA
M. spec. M.o.H.	7.43	Batch 1 tryp
M. ruminantium M1	18.64	Batch 1 tryp
M. ruminantium M1	10.30	Batch 2 tryp, EDTA
M. thermoautotrophicum	10.00	Batch 3 SDS
M. thermoautotrophicum	15.00	Batch 3 tryp

Tabelle 13. Aschegehalt (%)

Mit SDS-Behandlung konnten 30% entfernt werden. Allerdings wurde dabei Kalium gegen Natrium ausgetauscht (Tabelle 14) .

Species	K^+	Na^+	Ca^{++}	Mg^{++}	ZW-Charge
M. spec. M.o.H.	7.48	20.30	o	o	Batch 1 tryp
M. ruminantium M1	2.63	10.91	o	o	Batch 1 tryp
M. thermoautotrophicum	0.70	16.50	0.50	2.40	Batch 3 SDS
M. thermoautotrophicum	18.30	6.30	2.00	3.60	Batch 3 tryp

Tabelle 14. Ascheanalyse (%)

Die Kationenanalyse erbrachte weniger als 30% des Aschegewichtes. Man muß annehmen, daß die Kationen von den negativen Ladungen der organischen Bestandteile des Sacculuspolymers kompensiert und gebunden werden. Die bestimmten anorganischen Anionen reichen nicht aus, um die Ladungen der Kationen auszugleichen. Danach würden die Kationen größtenteils als Oxide in der Asche vorliegen. Aber auch daraus ergibt sich keine befriedigende Bilanz. Möglicherweise liegt die Ursache darin, daß die Kationen zu niedrig bestimmt wurden, denn es standen nur mg-Mengen von Zellwänden für die Analysen zur Verfügung.

3.2.7. Zusammenstellung der Zellwandkomponenten

Tabelle 15 zeigt eine Zusammenfassung der gefundenen Zellwandbestandteile in Gew.-%.

Zum Vergleich ist eine Zellwandanalyse von Micrococcus lysodeikticus (TCA-extrahiert) aufgeführt. Die Summierung der Verbindungen ergibt 81.28%. Daraus läßt sich annähernd die Zerstörungsrate nach saurer Hydrolyse abschätzen.

Species	Amino-säuren, NH_3	Amino-zucker	TalNU[1)]	Acetat	Neutral-zucker	Asche	Summe	ZW-Charge
M. formicicum	22.80	14.32	7.14	7.38	12.95[2)]	8.32	72.91	Batch 1 tryp, SDS
M. spec. M.o.H.	28.12	13.43	8.49	12.54	16.74	7.43	86.75	Batch 1 tryp
M. ruminantium M1	22.73	10.56	8.11	11.04	4.00	18.64	75.08	Batch 1 tryp
M. thermoauto-trophicum	35.89	12.17	11.77 (13.02)[4)]	11.22	2.16[3)]	15.00	88.21 (89.46)[4)]	Batch 3 tryp
M. thermoauto-trophicum	41.53	17.18	13.32	10.04	1.98[3)]	10.00	94.05 (99.05)[4)]	Batch 3 SDS
Micrococcus lysodeikticus	37.49	17.23	18.34[5)]	8.22[6)]	o	o	81.28	Schleifer und Kandler 1967a

Tabelle 15. Zusammenstellung der Zellwandkomponenten (%)
(Die Angaben beziehen sich auf die freien Verbindungen)

1)= äquimolar zu Lys

2)= Batch 1, tryp

3)= Phenolmethode

4)= äquimolar zu GlcN

5)= Mur

6)= äquimolar zu GlcN + Mur

o = nicht bestimmt

Es ergeben sich im Aminosäuren und Aminozuckergehalt gute Annäherungswerte mit M. thermoautotrophicum. Es ist zu berücksichtigen, daß die Werte für die freien Verbindungen gelten. Das bei der Hydrolyse aufgenommene Wasser wurde nicht abgezogen. Die erfaßten Komponenten ergeben bei M. thermoautotrophicum einschließlich der anorganischen Bestandteile etwa 90%, bzw. 99%, wenn äquimolare Mengen von TalNU und GlcN angenommen werden (Batch 3, SDS). Daraus läßt sich schließen, daß wahrscheinlich alle Bestandteile erfaßt wurden.

Relativ niedrige Werte, ca. 75%, ergeben sich für M. ruminantium und M. formicicum. Das hohe Verhältnis von Lys: NH_3 = 1.5 - 1.8 nach Gesamthydrolyse ist ein Hinweis für eine hydrolyselabile unbekannte Verbindung bei M. formicicum. Bei diesen beiden Arten sind daher möglicherweise nicht alle Verbindungen erfaßt worden.

Dasselbe könnte auch für M. spec. M.o.H. gelten, obwohl dort die Ausbeuten um 10% höher liegen.

3.3. Versuche zur Strukturaufklärung

Die Ergebnisse zur Struktur des Zellwandsacculus von Methanobacterium wurden größtenteils durch Untersuchungen von M. thermoautotrophicum gewonnen und nur in einzelnen Punkten bei den anderen Species überprüft.

3.3.1. Versuche zur Auftrennung in verschiedene Polymere durch Extraktion oder Enzymbehandlung

Die Zellwände wurden verschiedenen Extraktionsverfahren unterworfen. Diese Behandlungen sollten zur Klärung der Frage beitragen, ob es sich bei den Aminosäuren-, Aminozucker- und Neutralzuckeranteilen um kovalent verknüpfte Verbindungen oder um getrennte Polymere handelt.

Mit Formamid konnten die Neutralzucker größtenteils entfernt werden, so daß sie nicht zu den eigentlichen Strukturkomponenten des Sacculus gehören.

Species		Aminosäuren				NH_3	Aminozucker		Neutralzucker			ZW-Behandlung
		Ala	Glu	Lys	Thr		GalN	GlcN	Gal	Glc	Man	
M. arbophilicum	a.	0.73	1.02	0.48	-	0.56	0.32	-	o	o	o	Batch 1, tryp
	b.	1.52	2.13	1.00		1.16	0.67					
	a.	0.66	1.14	0.49	-	0.57	0.37	-	o	o	o	HF, 0°C, 3h
	b.	1.35	2.33	1.00		1.16	0.76					
M. spec. M.o.H.	a.	0.61	1.05	0.44	-	0.49	0.20	0.55	0.37	0.04	0.52	Batch 1, tryp
	b.	1.39	2.39	1.00		1.12	0.45	1.25	0.84	0.09	1.18	
	a.	0.59	1.07	0.49	-	0,54	0.14	0.55	o	o	o	HF, 0°C, 3h
	b.	1.18	2.15	1.00		1.09	0.28	1.11				
	a.	0.84	1.49	0.64	-	o	0.18	0.72	0.06	0.00	0.11	Formamid
	b.	1.32	2.34	1.00			0.28	1.13	0.09	0.00	0.17	
M. ruminantium M1	a.	-	1.06	0.55	0.52	0.93	0.41	0.31	o	o	o	Batch 2, tryp, EDTA
	b.		1.91	1.00	0.94	1.68	0.74	0.56				
	a.	-	1.11	0.62	0.58	0.86	0.41	-	o	o	o	HF, 0°C, 3h
	b.		1.79	1.00	0.94	1.39	0.66					
M. ruminantium PS	a.	0.68	1.36	0.80[1]	-	0.52	0.28	0.32	o	o	o	Batch 2, tryp
	b.	0.85	1.70	1.00		0.65	0.35	0.40				
	a.	0.54	1.08	0.60[2]	-	0.50	0.18	0.21	o	o	o	HF, 0°C, 3h
	b.	0.90	1.80	1.00		0.83	0.30	0.35				

(Fortsetzung Seite 67)

M. thermoauto-trophicum	a. 0.69	1.35	0.57	-	0.26	0.09	0.69	-	0.07	-		Batch 1, tryp
	b. 1.21	2.37	1.00		0.45	0.15	1.21		0.12			
	a. 0.72	1.37	0.58	-	0.19	0.07	0.65	o	o	o		Phenol
	b. 1.24	2.36	1.00		0.32	0.12	1.12					
	a. 0.77	1.43	0.64	-	0.22	0.06	0.64	o	o	o		TCA
	b. 1.20	2.23	1.00		0.34	0.09	1.00					
	a. 0.79	1.46	0.62	-	o	0.04	0.66	o	0.02	o		Formamid
	b. 1.27	2.35	1.00			0.06	1.06		0.03			
	a. 0.70	1.38	0.58	-	0.41	0.02	0.70	o	o	o		HF, 0^{o}, 3 h
	b. 1.21	2.38	1.00		0.72	0.05	1.21					
	a. 0.69	1.35	0.58	-	0.27	0.07	0.66	o	o	o		NaOH
	b. 1.19	2.33	1.00		0.47	0.12	1.14					
	a. 0.70	1.27	0.58	-	0.40	0.04	0.45	o	o	o		Ammonolyse
	b. 1.21	2.19	1.00		0.69	0.07	0.78					
	a. 0.61	1.22	0.49	-	0.21	0.06	0.60	o	o	o		Myxobacter-L_{11}-Enzym
	b. 1.24	2.49	1.00		0.43	0.12	1.22					
	a. 0.65	1.22	0.51	-	0.15	0.07	0.73	o	o	o		Proteinase K
	b. 1.27	2.39	1.00		0.31	0.14	1.42					
	a. 0.69	1.29	0.54	-	0.15	0.12	0.66	o	o	o		Pepsin
	b. 1.28	2.39	1.00		0.29	0.22	1.24					
	a. 0.74	1.38	0.63	-	0.22	0.07	0.56	o	o	o		Pronase
	b. 1.17	2.19	1.00		0.34	0.11	0.88					
	a. 0.58	1.09	0.50	-	0.23	0.07	0.54	o	o	o		0.01 n HCl
	b. 1.16	2.18	1.00		0.46	0.14	1.08					
	a. 0.70	1.25	0.60	-	0.20	+	0.55	o	o	o		Glycosidasen
	b. 1.17	2.08	1.00		0.33		0.92					(Batch 3, SDS)

Tabelle 16. Zusammensetzung der Zellwände nach Extraktion oder Enzymbehandlung

1) = enthält 0.16 Orn
2) = enthält 0.12 Orn

Nach TCA-, Formamid- und Phenolbehandlung wurden die Aminosäuren und Aminozucker nahezu quantitativ im unlöslichen Zentrifugat gefunden. Daher ist anzunehmen, daß diese Komponenten kovalent verknüpft sind. Esterartige Bindungsverhältnisse konnten durch Ammonolyse oder NaOH-Extraktion ausgeschlossen werden. Eine Ausnahme macht M. ruminantium M1. Glucosamin wurde mit HF (0°C, 3 h) abgespalten. Dieses Ergebnis deutet auf eine Phosphodiesterbindung hin. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Ebenso ist aus Tabelle 16 zu ersehen, daß die üblichen Proteasen und Glycosidasen keine Hydrolyse des Sacculus bewirkten, möglicherweise wegen der ξ- und γ-Bindungen der Aminosäuren (3.3.2.) und der ungewöhnlichen Zusammensetzung des Glycanstranges (3.3.3.) .

3.3.2. Charakterisierung der Peptidkomponente

Die Struktur der Peptidkomponente wurde mit Hilfe überlappender Peptide und Bestimmung der C- und N-Termini aufgeklärt.

3.3.2.1. Isolierung und Identifizierung von überlappenden Peptiden

Zunächst wurden die optimalen Hydrolysebedingungen durch eine Hydrolysekinetik ermittelt. Dazu wurden Zellwandhydrolysate nach verschiedenen Inkubationsbedingungen (4 n HCl oder 1n HCl, 5 - 180 min, 100°C, gesättigte $Ca(OH)_2$-Lösung, 1 - 24 h) auf dem Aminosäureanalysator aufgetrennt. Es wurden 19 Peaks erhalten, neben Glu, Ala, GlcN und NH_3. Die beste Ausbeute wurde mit 4 n HCl bei einer Hydrolysezeit von 30-45 min. erreicht. Die alkalische Partialhydrolyse erbrachte keine zusätzlichen Peaks.

Nach der Partialhydrolyse der Zellwand wurden die freigesetzten Peptide zunächst auf Whatman Nr. 3 eindimensional in den Laufmitteln Isopropanol/Eisessig/H_2O und α-Picolin/NH_3/H_2O je 3 x 24 h chromatographiert. Eine weitere Reini-

Peptid Nr.	Chromatographie R_{Ala} A	B	R_f C	R_{NH_3}	Molverhältnis Ala	Glu	Lys	Hydrolyseprodukte der DNP-Peptide	Freie Aminosäuren nach Hydrazinolyse	Struktur der Peptide
1	0.98	0.57	0.46	0.19	1	1	-	DNP-Glu, Ala	o	Glu → Ala
2	0.30	0.36	0.33	0.69	-	1	1	DNP-Glu ε-DNP-Lys	o	Glu → Lys
3	0.44	0.31	0.30	1.01	-	1	1	Di-DNP-Lys	o	Lys → Glu
4	0.44	0.86	0.65	1.05	1	-	1	DNP-Ala α-DNP-Lys	o	Ala Lys
5	0.30	0.68	0.41	0.62	1	1	1	DNP-Glu α-DNP-Lys Ala	o	Glu → Ala Lys
6	0.35	0.65	0.47	0.69	1	1	1	DNP-Glu DNP-Ala Lys	o	Glu → Lys Ala
7	0.30	0.23	0.21	0.64	-	2	1	DNP-Glu ε-DNP-Lys Glu	o	Glu → Lys → Glu
8	0.54	0.53	0.43	0.97	1	1	1	DNP-Ala α-DNP-Lys Glu	o	Ala Lys → Glu

(Fortsetzung Seite 70)

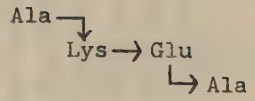
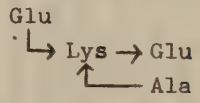
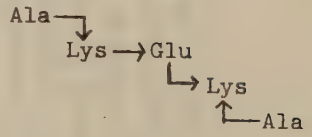
9	0.61	1.01	0.62	1.00	2	1	1	DNP-Ala α-DNP-Lys Ala, Glu	Ala	
10	0.30	0.43	0.27	0.64	1	2	1	DNP-Glu DNP-Ala Glu, Lys	o	
11	0.25	0.79	0.49	o	2	1	2	DNP-Ala α-DNP-Lys Glu, Lys	Lys	

Tabelle 17. Analyse der Peptide nach Partialhydrolyse der Zellwände von M. thermoautotrophicum

o = nicht bestimmt

- = nicht vorhanden

A = Isopropanol/Eisessig/H_2O (Whatman Nr. 3, 3x24 h)

B = α-Picolin/NH_3/H_2O (Whatman Nr. 3, 3x24 h)

C = Propanol/NH_3/H_2O (Dünnschicht, Cellulose)

R_{NH_3} = Aminosäureanalysator

gung erfolgte auf Dünnschicht (Cellulose) in Propanol/ NH_3/H_2O. Die so isolierten Peptide wurden zur Kontrolle der Reinheit unhydrolysiert auf dem Aminosäureanalysator chromatographiert. Falls notwendig wurde ein weiterer Reinigungsschritt angeschlossen. Dann wurden die Zusammensetzung und die freien Aminogruppen bestimmt. Größere Peptide wurden auch der Hydrazinolyse unterworfen. Die Analyse der isolierten Peptide ist aus Tabelle 17 zu ersehen.

Die Bindungsverhältnisse der Glu/Lys- und der Glu/Ala-Peptide wurde durch Cochromatographie mit authentischen Peptiden und Photolyse (Perkins 1967) der DNP-Derivate bestimmt. Die Peptide α-Glu-Glu, γ-Glu-Glu, α-Glu-Ala und γ-Glu-Ala konnten auf dem Aminosäureanalysator in Citratpuffern von pH 3.0 und 3.6 bei konstanter Säulentemperatur von 55°C aufgetrennt werden (Abb. 5). Aus Zellwandhydrolysaten wurden 2 Peaks mit R_{NH_3}-Werten von γ-Glu-Ala und γ-Glu-Glu erhalten. Nur γ-Glu-Ala konnte auf zweidimensionalen Cochromatogrammen auf Papier gefunden werden. Die charakteristischen Peptide des Mureins D-Ala-D-Ala und Ala-D-Glu wurden auch nicht in der entsprechenden L-Konfiguration gefunden.

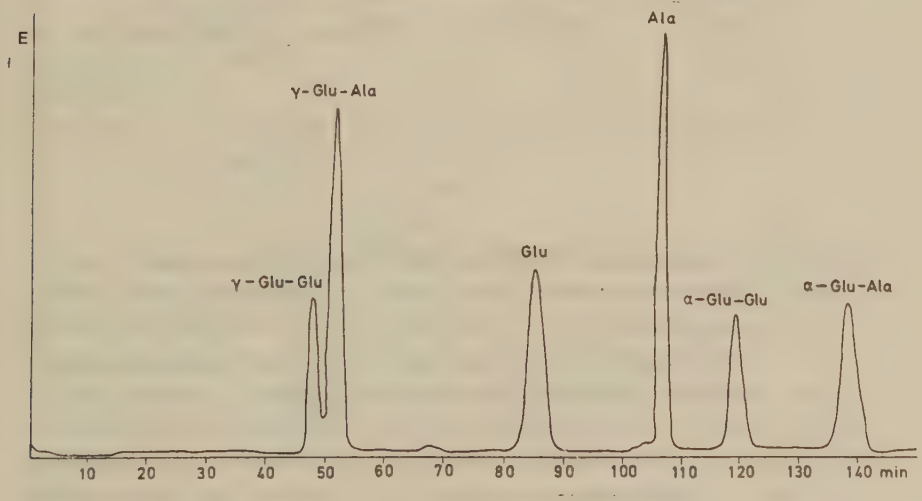


Abb.: 5. Auftrennung der Glu-Glu- und Glu-Ala-Peptide auf dem Aminosäureanalysator

Die Lys/Glu-Peptide konnten mit dem üblichen Analysatorprogramm getrennt werden. γ-Glu-Lys eluiert mit GlcN (R_{NH_3} = 0.69), γ-D-Glu-L-Lys dagegen nach GlcN (R_{NH_3} = 0.75, Schleifer und Kandler 1972), Lys-Glu mit einem R_{NH_3}-Wert von 1.01. α-Glu-Lys verhält sich noch basicher als Lys (R_{NH_3} = 1.05).

Adfgrund der Analyse der überlappenden Peptide wurde die in Abb. 6 gezeigte Struktur für die Peptiduntereinheit angenommen.

Die Monomeren und Dimeren sind über die Aminogruppe der Glutaminsäure mit dem Glycan verbunden (3.3.3.).

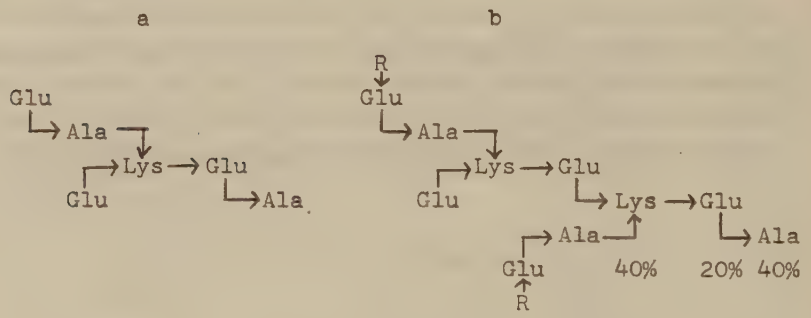


Abb.: 6. Angenommene Struktur der Peptiduntereinheit (a) und des Dimeren (b).
R = TalNU
Die Zahlen geben den Gehalt an C-terminalen Aminosäuren im unvollständigen Dimer an.

3.3.2.2. C- und N-terminale Aminosäuren des intakten Sacculus

Es zeigte sich durch Dinitrophenylierung , daß der N-Terminus (Tabelle 18) des intakten Sacculus im wesentlichen nur von Glutaminsäure gebildet wird. Die ermittelten 21% für Glutaminsäure bei M. thermoautotrophicum stimmen gut mit der angenommenen Struktur überein. (Abb. 6).

Species	Aminosäuren (%)			ZW-Charge
	Ala	Glu	ε-Lys	
M. arbophilicum	-	21.00	-	Batch 1 tryp
M. formicicum	1.25	12.83	1.62	Batch 1 tryp
M. spec. M.o.H.	2.73	18.00	2.87	Batch 1 tryp
M. ruminantium M1	0.53 (Thr)	6.00	0.53	Batch 1 tryp
M. thermoautotrophicum	2.90	21.00	-	Batch 1 tryp

Tabelle 18. Bestimmung freier NH_2-Gruppen des intakten Sacculus
- = nicht vorhanden

Die Position der N-terminalen Glutaminsäure in der intakten Peptidkomponente wurde durch Isolierung von DNP-Peptiden aus Partialhydrolysaten von DNP-Zellwänden ermittelt (Tabelle 19).

Es wurden 2 Peptide isoliert, deren Struktur durch weitere Dinitrophenylierung und Partialhydrolyse bestimmt wurde. Nach UV-Bestrahlung (350 nm, 5-15 min) der isolierten DNP-Peptide zeigte sich eine Extinktionszunahme bei 284 nm und eine Abnahme bei 348 nm. Das zeigt, daß DNP-Glu in γ-Bindung vorliegt. Als Vergleich dienten α-DNP-Glu-Ala und

Peptid Nr.	Chromatographie A	Chromatographie B	Hydrolyseprodukte Molverhältnis DNP-Glu	Ala	Glu	Lys	Hydrolyseprodukte nach Dinitrophenylierung der DNP-Peptide	Struktur
1	R_{Ala} 1.07	$R_{DNP-Ala}$ 1.79	1	1	1	1	DNP-Glu, DNP-Ala, Glu, Lys	DNP-Glu Lys Glu Ala
2	R_f 0.69	R_f 0.72	1	1	-	1	DNP-Glu, DNP-Ala, Lys	DNP-Glu Lys Ala

Tabelle 19. Analyse der DNP-Peptide nach Partialhydrolyse der DNP-Zellwände von M. thermoautotrophicum

- = nicht vorhanden

A = -Picolin/NH_3/H_2O

B = 1.5 m Phosphatpuffer pH 6

γ-DNP-Glu-Ala, die aus käuflichen Peptiden hergestellt wurden. Durch Analyse der DNP-Peptide wurde nachgewiesen, daß die Glutaminsäure, die mit der γ-Carboxylgruppe an Lysin gebunden ist, die freie Aminogruppe trägt und nicht diejenige, die an Alanin gebunden ist, denn das Alanin der isolierten DNP-Peptide ist dinitrophenylierbar.

Die Ergebnisse der Hydrazinolyse zeigen, daß alle 3 Aminosäuren C-terminal vorliegen (Tabelle 20).

Species	Aminosäuren (%)				ZW-Charge
	Ala	Glu	Lys	γ-Glu-Hydrazid	
M. arbophilicum	32.15	3.50	5.60	o	Batch 1 tryp
M. formicicum	29.20	-	8.43	o	Batch 1 tryp
M.spec.M.o.H.	15.25	0.35	16.12	o	Batch 1 tryp
M. ruminantium M1	-	-	11.26	o	Batch 1 tryp
M. thermoautotrophicum	13.28	4.22	8.93	29.25	Batch 1 tryp

Tabelle 20. Bestimmung freier Carboxylgruppen des intakten Sacculus
o = nicht bestimmt
- = nicht vorhanden

Die ermittelten Werte ergeben gute Übereinstimmung mit der vorgeschlagenen Struktur, wenn man annimmt, daß vom vollständigen Dimer nur 40% C-terminales γ-Glu-Ala und 20% Glu vorliegen. Ein Lysin des Dimeren sollte nach dieser Annahme zu 40% C-terminal sein. Es wurden aber nur 17.86% gefunden. Dieses Ergebnis ist möglicherweise auf die Zersetzung von Lysin bei der Hydrazinolyse oder die Stabilität der ε-Ala-Lys-Bindung zurückzuführen.

Von den beiden Carboxylgruppen der Glutaminsäure ist nur die γ-Carboxylgruppe an Peptidbindungen beteiligt. Denn nach Hydrazinolyse der Zellwand wurde nur das γ-Hydrazid der Glutaminsäure als Di-DNP-Derivat nachgewiesen.

3.3.3. Charakterisierung der Glycankomponente

3.3.3.1. Isolierung

100 mg Zellwände wurden mit 2 n NaOH 16 h bei 60°C inkubiert. Dann wurde zentrifugiert. Der unlösliche Niederschlag wog nach Trocknung 7.8 mg. Er wurde nicht weiter untersucht. Der Überstand wurde dialysiert, gefriergetrocknet und über Nacht bei 105°C nachgetrocknet. Auf diese Weise wurden 46 mg lösliche Glycankomponente erhalten. Dann wurde eine Fraktionierung auf Sephadex G50 (Säule: 3 x 75cm, V_o = 151 ml) vorgenommen. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 2 ml/min. Es wurden 6-ml-Fraktionen aufgefangen.

Weiterhin wurden Glycanstränge unter reduktiven Bedingungen (2.4.1.) und nach Behandlung mit Hydrazin (2.4.2.) gewonnen.

3.3.3.2. Molekulargewicht

Durch Gelfiltration auf Sephadex G 50 wurde das Dialysat in 4 sich stark überlappende Elutionshauptmaxima aufgetrennt, die kurz nach dem Ausschlußvolumen eluierten. Das Elutionsprofil zeigt Abb. 7. Das Ausschlußvolumen von Sephadex G 50 beträgt 30 000 für Proteine und 10 000 für Glycane. Da der sterische Korrekturfaktor für die Glycankomponente, die noch Reste des Peptids enthielt, nicht bekannt ist, kann nur ein Molekulargewicht von etwa 10 000 bis 30 000 angenommen werden. Das entspricht unter Berücksichtigung der Restaminosäuren etwa einer Länge von 17 - 68 Disaccharideinheiten, wenn man die Werte aus Tabelle 21 zu Grunde legt.

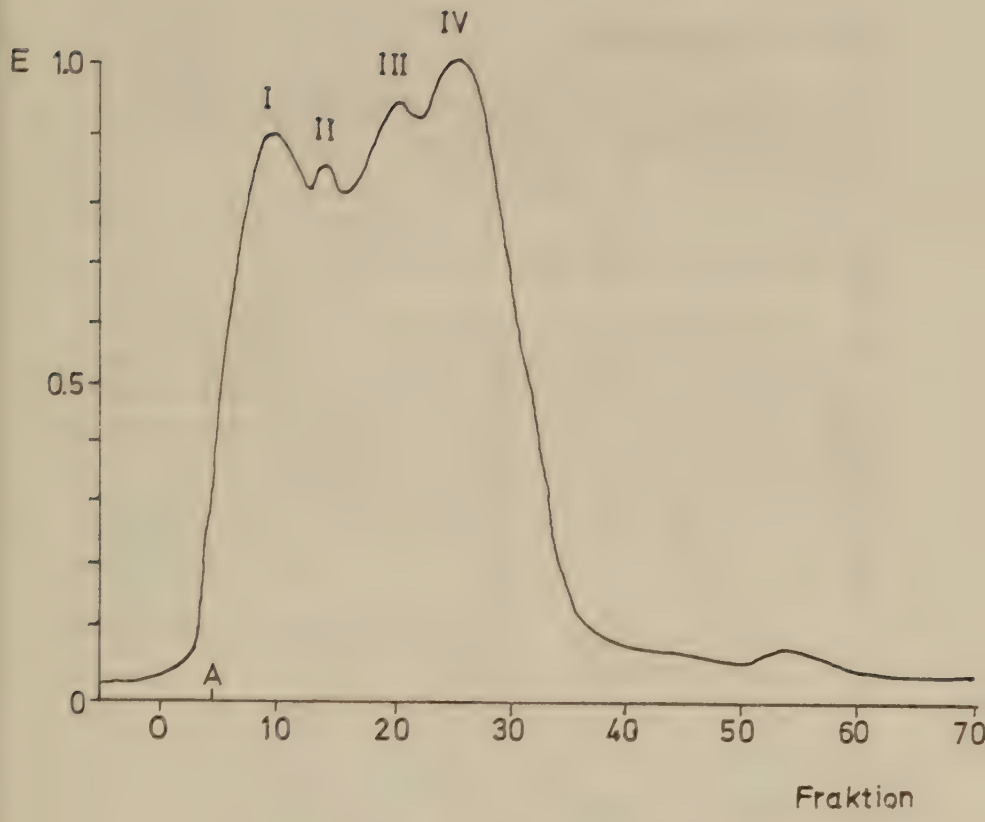


Abb.: 7
Auftrennung der Glycankomponente nach NaOH-Behandlung und Dialyse auf Sephadex G 50.
Die Fraktionen wurden zu Hauptfraktionen zusammengefaßt:
I = Fraktion 4-11 III = Fraktion 17-21
II = Fraktion 12-16 IV = Fraktion 22-32
A = Ausschlußvolumen (V_o= 151 ml)

3.3.3.3. Zusammensetzung

Die Zusammensetzung eines Gesamtdialysates ohne Fraktionierung über Sephadex zeigt Tabelle 21.

Behandlung		Zusammensetzung								
		Ala	Glu	Lys	GlcN	GalN	NH_3	Peptide	TalNU (Lacton)	DNP-Derivat
4 n HCl, 100°C, 16 h	a	0.20	0.56	0.08	0.96	0.07	0.52	-	-	-
	b	0.21	0.58	0.08	1.00	0.07	0.54			
4 n HCl, 100°C, 20 min	a	o	o	o	o	o	o	γ-Glu-Ala	0.40	-
								ε-Ala-Lys		
Hydrazin[1]	a	0.09	0.05	0.01	-	-	o	-	-	-
DNP	a	0.21	0.57	0.04	1.39	0.07	0.45	-	-	α-DNP-Lys
	b	0.15	0.41	0.03	1.00	0.05	0.32			

Tabelle 21. Untersuchung des Glycanstranges, Präparation I (µMol/mg)

1) = Hydrazinolysegrad nicht bestimmt
o = nicht bestimmt
- = nicht vorhanden
a = µMol/mg
b = Molverhältnisse

Im Gegensatz zum intakten Sacculus wurde nach Hydrolyse ein verändertes Molverhältnis der Verbindungen festgestellt. Das Verhältnis von Ala, Glu und GlcN betrug nun 0.2 : 0.6 : 1.0. Daraus ist zu ersehen, daß ein Großteil der Peptidbindungen hydrolysiert wurde, während die glycosidischen Bindungen stabiler waren. Relativ stabil ist auch die Bindung der Glutaminsäure ans Glycan, dagegen wurde die ε-Ala-Lys-Bindung leicht gespalten.

Nur noch 10% Lysin wurde im Vergleich zu Glucosamin im Hydrolysat gefunden.

In einer weiteren Präparation wurde nach Dialyse eine Fraktionierung über Sephadex vorgenommen. Es wurden 4 Elutionsmaxima erhalten, deren Zusammensetzung in Tabelle 22 aufgeführt ist. Die 4 Elutionsmaxima besaßen etwa die gleichen Molverhältnisse wie das Gesamtdialysat. Lediglich die Glutaminsäuremenge betrug nur noch die Hälfte der Glucosaminmenge. Lysin war in dieser Präparation nur noch in Spuren vorhanden.

Fraktionen		Zusammensetzung					
		Ala	Glu	Lys	GlcN	GalN	NH_3
I	a	0.17	0.45	+	0.93	0.02	0.23
	b	0.18	0.49		1.00	0.02	0.24
II	a	0.17	0.41	+	0.84	0.03	0.39
	b	0.20	0.48		1.00	0.04	0.47
III	a	0.15	0.38	+	0.79	0.02	0.35
	b	0.19	0.48		1.00	0.03	0.45
IV	a	0.15	0.40	+	0.85	0.04	0.30
	b	0.18	0.47		1.00	0.05	0.35

Tabelle 22. Zusammensetzung der Glycankomponente nach Gelfiltration (Sephadex G 50) Präparation II
(2 n NaOH, 16 h, 60°C)
(µMol/mg) + = Spur

Wurde der Sacculus unter reduktiven Bedingungen mit NaOH inkubiert, so wurden auf Sephadex 3 überlappende Fraktionen erhalten. Diese besaßen kaum veränderte Molverhältnisse oder Gesamtausbeuten (Tabelle 23).

Fraktionen		Zusammensetzung					
		Ala	Glu	Lys	GlcN	GalN	NH_3
I	a	0.14	0.38	+	0.75	-	0.35
	b	0.18	0.50		1.00		0.47
II	a	0.14	0.39	+	0.78	-	0.36
	b	0.18	0.51		1.00		0.47
III	a	0.14	0.41	+	0.84	-	0.57
	b	0.18	0.49		1.00		0.68

Tabelle 23. Zusammensetzung der Glycankomponente nach Gelfiltration (Sephadex G 50) Präparation II, reduktive Bedingungen (2 n NaOH, 16 h, 60°C) (µMol/mg) + = Spur

Auch eine Inkubation mit Hydrazin für 10 h bei 100°C erbrachte ähnliche Ergebnisse (Tabelle 24). Allerdings die Summe der gefundenen Verbindungen und das Verhältnis von Glu zu GlcN war erniedrigt. Durch verlängerte Inkubation konnte der Peptidanteil bis auf geringe Glutaminsäurereste entfernt werden (Tabelle 25).

Die Addition der nach Hydrolyse erfaßten Verbindungen ergab nur 39% des eingesetzen Gewichtes, wenn TalNU äquimolar zu GlcN angenommen wird. Werden die Werte entsprechend der gefundenen Acetatmenge korrigiert, so erhöht sich der Wert auf 69% (Tabelle 26). Wenn man von dem eingesetzten Gewicht den Aminosäureanteil abzieht, so bleiben 93% für den reinen Glycananteil. Es wurden 31%, korrigiert mit der gefundenen Acetatmenge 62% gefunden, bzw. 46% nach Abzug des Acetats. Man muß annehmen, daß die restlichen 30% des

Behandlung		Zusammensetzung (µMol/mg)								
		Ala	Glu	Lys	GlcN	GalN	NH_3	TalNU (Lacton)	TalNU	Acetat
4n HCl, 100°C 16h	a	0.10	0.22	0.04	0.59	0.06	0.20	-	-	0.48
	b	0.17	0.38	0.07	1.00	0.10	0.34			0.81
DNP	a	0.10	0.22	0.01	0.75	0.06	0.30	-	-	o
	b	0.13	0.30	0.01	1.00	0.08	0.40			
PH	a	0.04	0.09	-	0.44	0.03	0.06	0.18	0.04	o
	b	0.09	0.20		1.00	0.07	0.14	0.41	0.09	
DNP, PH	a	0.03	0.07	-	0.46	0.03	0.10	0.14	0.04	o
	b	0.07	0.15		1.00	0.07	0.22	0.30	0.09	
HF, unhydrolysiert	a	-	-	-	-	-	-	-	-	o

Tabelle 24. Analyse der Glycankomponente, isoliert nach Hydrazinbehandlung der ZW (10 h, 100°C)
PH = Partialhydrolyse (4n HCl, 100°C, 30 min)

Behandlung		Zusammensetzung (µMol/mg)					
		Ala	Glu	Lys	GlcN	GalN	NH_3
4 n HCl, 100°C, 16 h	a	-	0.03	-	0.67	0.10	0.40
	b		0.04		1.00	0.15	0.60
DNP	a	-	0.03	-	0.70	0.06	0.31
	b		0.04		1.00	0.09	0.44

Tabelle 25. Analyse der Glycankomponente, isoliert nach Hydrazinbehandlung der ZW (88 h, 80°C)

Glycans deacetyliert vorliegen und damit schwer hydrolysierbar sind. Die freien Aminogruppen stabilisieren die glycosidischen Bindungen, so daß die Aminozucker zu nierig bestimmt werden.

Behandlung		Zusammensetzung					
		Ala	Glu	GlcN	GalN	NH_3	Acetat
4n HCl, 14 h, 100°C	a	0.15	0.40	0.85	0.04	0.30	2.51
	b	0.18	0.47	1.00	0.05	0.35	
$NaBH_4$	a	0.15	0.37	0.74	o	0.31	o
	b	0.20	0.50	1.00		0.42	
$NaJO_4$	a	0.18	0.37	0.64	o	0.64	o
	b	0.28	0.58	1.00		1.00	
Hydrazin[1)]	a	0.09	0.06	-	-	0.02	o
DNP	a	0.12	0.31	0.73	o	0.37	o
	b	0.16	0.42	1.00		0.51	

Tabelle 26. Untersuchung der Glycankomponente, Präparation II, Fraktion IV
(µMol/mg)
o = nicht bestimmt
- = nicht vorhanden
1) = Hydrazinolysegrad nicht bestimmt

Zum Vergleich diente eine Glycanpräparation von Micrococcus lysodeikticus, die nach der obigen Methode gewonnen wurde. Auch hier wurden nach der Hydrolyse nur 45% der Verbindungen erfaßt (Tabelle 27).

	Mur	Glu	Ala	Lys	GlcN	NH_3
a.	0.67	0.10	0.23	0.07	0.90	0.30
b.	0.74	0.11	0.25	0.08	1.00	0.33

Tabelle 27. Zusammensetzung des Glycans von Micrococcus lysodeikticus (2 n NaOH, 16 h, 60°C)
a. = µMol/mg
b. = Molverhältnisse

3.3.3.4. Bindung der Peptideinheit an den Glycanstrang

Die Bindungsverhältnisse der Aminosäuren am Glycan wurden durch Partialhydrolyse, Hydrazinolyse und Dinitrophenylierung bestimmt (Tabellen 21, 26, 24).

Es wurden die Peptide ε-Ala-Lys und γ-Glu-Ala, sowie α-DNP-Lys als einziges DNP-Derivat, jedoch alle drei Aminosäuren C-terminal gefunden. Die Werte für die C-Termini sind nicht korrigiert. Normalerweise wurde die Glycinausbeute nach Hydrazinolyse von Zellwänden von Micrococcus lysodeikticus als Basis für die Korrektur verwendet. Sie liegt bei 40 - 60%. Doch kann dieser Korrekturfaktor hier nicht verwendet werden, da Glutaminsäure ungleich schwerer abgespalten wird. Selbst nach verlängerter Hydrazinolyse (Tabelle 25) wurde die restliche Glutaminsäure nicht vollständig entfernt. Daher sind die angegebenen Werte für die C-Termini zu niedrig.

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, daß das Tripeptid Glu γ Ala ε Lys über die Aminogruppe der Glutaminsäure an den Glycanstrang gebunden ist. Da der Talosaminuronsäuregehalt nach Diazomethan- und $LiBH_4$-Behandlung in Zellwandpartialhydrolysaten nicht abnimmt (Tabelle 28), sollte die Carboxylgruppe der Talosaminuronsäure nicht frei vorliegen. Es ist eher anzunehmen, daß sie über eine Peptidbindung mit Glutaminsäure substituiert ist, denn Ester- oder Amidbindungen, wie sie in Glycoproteinen vorliegen (Gottschalk et al. 1962) , konnten durch NaOH-Behandlung und Ammonolyse ausgeschlossen werden.

Glu	TalNU	
0.38	0.10	4 h, 65°C
0.36	0.11	unbehandelt

Tabelle 28. Inkubation der Zellwand von M. thermoautotrophicum (Batch 3, tryp) mit Diazomethan und $LiBH_4$ (Werte nach Partialhydrolyse von 30 min. ermittelt)
(µMol/mg)

3.3.3.5. Verknüpfung der Glycanmonomeren

Nach Inkubation mit $NaBH_4$, DNP und $NaJO_4$ wurde wie auch in der Gesamtzellwand keine wesentliche Änderung der Molverhältnisse festgestellt (Tabellen 21, 24, 26, 29, 30).

	Ala	Glu	Lys	GlcN	NH_3	TalNU(Lacton)	
a.	0.84	1.32	0.72	0.76	0.44	0.11 (0.11)[1)]	unge-puffert
b.	1.17	1.83	1.00	1.06	0.61	0.15	
a.	0.68	1.20	0.56	0.56	0.32	0.10	pH 5
b.	1.21	2.14	1.00	1.00	0.57	0.17	
a.	0.76	1.33	0.63	0.65	0.38	o	pH 4,5
b.	1.21	2.12	1.00	1.03	0.60		

Tabelle 29. Zusammensetzung der Zellwand von M. thermoautotrophicum (Batch 1, tryp) nach Perjodatbehandlung
1) = Wert ohne $NaJO_4$-Behandlung (Partialhydrolyse)
o = nicht bestimmt
a. = µMol/mg
b. = Molverhältnisse

	Ala	Glu	Lys	GlcN	NH_3
a.	0.76	1.32	0.64	0.68	0.32
b.	1.19	2.06	1.00	1.06	0.50

Tabelle 30. Inkubation der Zellwand von M. thermoautotrophicum (Batch 2, tryp, SDS) mit $NaBH_4$

a. = µMol/mg
b. = Molverhältnisse

Daraus läßt sich schließen, daß ein längerkettiger Glycantrang vorliegt, dessen Aminogruppen größtenteils N-acetyliert und dessen Monomeren 1,3 oder 1,4 verbunden sind. Mit Lysozym konnte der Glycanstrang nicht hydrolysiert werden.

Durch die Messung der optischen Drehung des Glycans wurden Aussagen über die anomere Konfiguration der Zucker möglich. Der Glycanstrang wurde durch verlängerte Inkubation mit NaOH (48 h, 60°C) bis auf geringe Glutaminsäurereste vom Peptid befreit. Das Molverhältnis von GlcN: Glu betrug nur noch 10 : 1. Es wurde ein Drehwinkel $[\alpha]_D^{22,3}$ = - 41.40° (c = 0.93, Wasser) gemessen.

Tetra-N-acetyl-chitotetrose und alle längerkettigen Homologe drehen negativ (Baer 1969), während Glycane beim Vorliegen von α-glycosidischen Bindungen einen positiven Drehsinn aufweisen. Daher wird für den Glycanstrang von M. thermoautotrophicum eine β-glycosidische Verknüpfung angenommen.

Ein völlig aminosäurefreies Glycan hätte wahrscheinlich einen noch negativeren Drehwinkel, da L-Glutaminsäure eine positive Drehung besitzt.

N-Ac-D-TalN oder D-TalN besitzen nur einen kleinen Drehwinkel von -11° bzw. -5.7° (Horton 1969). Da die entsprechende Uronsäure einen ähnlichen Drehwinkel besitzt, dürfte ihr Einfluß auf die Gesamtdrehung des Glycans nicht sehr hoch sein. Die aus diesen Ergebnissen sich ableitende Struktur des durch NaOH-Behandlung gewonnenen Glycans ist in Abb. 8 dargestellt. Dabei wurden die Werte der nach Hy-

drolyse erfaßten Verbindungen aus Tabelle 21 zu Grunde gelegt, die etwa nur 30% der eingesetzten Menge ergaben. Die restliche GlcN- und TalNU-Menge, die möglicherweise durch die NaOH-Behandlung so modifiziert wurde, daß sie als ursprüngliche Verbindungen nicht mehr nachweisbar waren, wurden dabei nicht berücksichtigt.

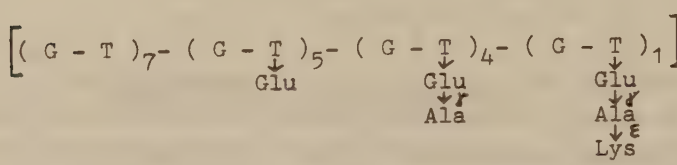


Abb.: 8 Struktur der Glycankomponente
(Werte aus Tabelle 21)
D-GlcN und TalNU sind N-acetyliert (G = GlcN, T = TalNU)
Bindung: β-1,4 oder β-1,3
I = Molekulargewicht von 7791

3.3.4. Charakterisierung der Untereinheiten

3.3.4.1. Hydrolyse der Sacculi mit Fluorwasserstoff

Mit HF ist eine selektive Spaltung von glycosidischen Bindungen möglich (Mort und Lamport 1977; Fiedler, pers. Mitteilung), während bei geeigneter Wahl der Inkubationsbedingungen die Peptidbindungen erhalten bleiben.

Die Zellwände wurden mit 70% HF bei 30° für 24 h inkubiert. Es wurden lösliche Zellwandbruchstücke erhalten, die auf dem Aminosäureanalysator als 1 Peak mit einem NH_3-Wert von 0.05 eluierten, also relativ negativ geladen waren. Auch eine verlängerte Hydrolyse von 48 h lieferte keine zusätzlichen Peaks. Es entstanden also keine Monomeren.

3.3.4.2. Analyse des Gesamthydrolysates

Die Dinitrophenylierung des Gesamthydrolysates zeigte, daß verglichen mit den intakten Sacculi keine neuen N-Termini entstanden waren (Tabelle 31).

Behandlung		Zusammensetzung					
		Ala	Glu	Lys	GlcN	NH_3	GlcN-itol
4 n HCl, 16 h, 100°C	a	0.10	0.19	0.09	0.11	0.09	-
	b	1.11	2.11	1.00	1.22	1.00	
DNP	a	0.08	0.11	0.07	0.08	0.16	-
	b	1.14	1.57	1.00	1.14	2.29	
$NaJO_4$	a	0.08	0.05	0.07	0.02	0.22	-
	b	1.14	0.71	1.00	0.29	3.14	
$NaBH_4$	a	0.09	0.16	0.07	0.05	0.05	0.04
	b	1.29	2.29	1.00	0.71	0.71	0.57

Tabelle 31. Untersuchung der Zellwand nach HF-Behandlung (30°C, 24 h)
(µMol/µl)

GlcN war zur Hälfte mit $NaBH_4$ reduzierbar und konnte mit Perjodat zerstört werden. Ebenso wurde Talosaminuronsäure mit Perjodat zu 3/4 oxidiert, wie Gehaltsbestimmungen aus Partialhydrolysaten vor und nach Perjodatbehandlung zeigten. Somit wurden mit HF unter diesen Bedingungen spezifisch glycosidische Bindungen gespalten, während Peptidbindungen nicht hydrolysiert wurden.

Die Inkubation mit $NaBH_4$ und $NaJO_4$ geben einen Hinweis, daß gemischte Disaccharide entstanden waren, die noch die vollständige Peptiduntereinheit trugen. Wäre nur eine Art von Disacchariden entstanden, sollte GlcN ganz oder gar nicht reduzierbar sein. Es ist anzunehmen, daß zunächst unspezifisch jeweils eine glycosidische Bindung des Glycanstranges gespalten wird, die Nachbarbindungen dann aber nicht

mehr hydrolysiert werden kann.

3.3.4.3. Auftrennung des HF-Hydrolysates auf Sephadex

Ein Elutionschema des HF-Hydrolysates auf einer Säulenkombination von Sephadex G 50 und G 25 ist in Abb. 9 dargestellt.

Das Hydrolysat eluierte größtenteils als ein Hauptmaximum, unterteilt in 3 Nebenmaxima (I = Fraktion 5-13, II = Fraktion 14-28, III = Fraktion 29-45). Es wurden 120 Fraktionen zu je 6 ml aufgefangen. Davon wurden 13 Fraktionen auf ihre Zusammensetzung untersucht (Tabelle 32).

Es stellte sich heraus, daß die untersuchten Fraktionen des Hauptmaximums im wesentlichen ähnliche Molverhältnisse und N-Termini wie die Gesamtsacculi besaßen. Auch wurden in Partialhydrolysaten die gleichen Peptide nachgewiesen. Alle 3 Aminosäuren liegen teilweise C-terminal vor. Die Lysinwerte liegen noch etwas über den Alaninwerten. Aber die Gesamtmenge wurde wahrscheinlich zu niedrig bestimmt, da auch zu geringe Mengen für die Hydrazinolyse zur Verfügung standen.

Wie im HF-Gesamthydrolysat konnte GlcN mit $NaBH_4$ zur Hälfte reduziert und mit $NaIO_4$ zerstört werden. Da die Glucosaminmenge nach Dinitrophenylierung nur gering abnahm, wurden die N-Acetylgruppen durch die HF-Hydrolyse nur gering entfernt. Ob auch TalNAc reduzierbar ist, wurde nicht bestimmt.

In der Gesamtzellwand wurde Glutaminsäure zu 21% N-terminal gefunden. Daraus geht hervor, daß Trimere nur in geringer Menge vorkommen können. Den Hauptanteil sollten die Dimeren bilden.

Nebenmaximum I könnte eine geringe Menge an Trimeren enthalten, da auch die Menge des N-terminalen Glu erniedrigt ist. Nebenmaximum II sollte die Dimeren enthalten, denn in Fraktion 17 ist Glutaminsäure zu 21% N-terminal.

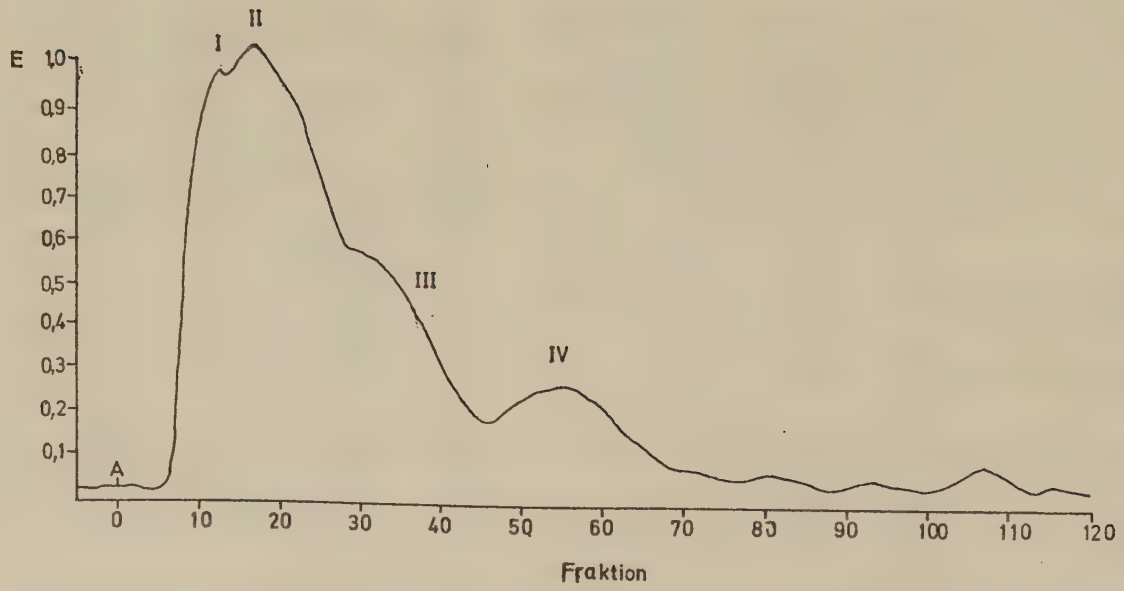


Abb.: 9 . Auftrennung der Spaltprodukte der Zellwand nach HF-Behandlung (30°C, 24 h) auf einer Kombination von Sephadex G 50 und G 25
A = Ausschlußvolumen (V_o= 480 ml)

Fraktion		Zusammensetzung					Zusammensetzung nach Dinitrophenylierung					C-terminale Aminosäuren		
		Ala	Glu	Lys	GlcN	NH_3	Ala	Glu	Lys	GlcN	NH_3	Ala	Glu	Lys
8	a	0.12	0.23	0.10	0.10	0.05	0.15	0.25	0.13	0.11	0.13	0.01	-	0.02
	b	1.20	2.30	1.00	1.00	0.50	1.15	1.92	1.00	0.85	1.00			
10	a	0.39	0.76	0.33	0.29	0.12	0.39	0.64	0.35	0.27	0.22	0.05	0.01	0.07
	b	1.18	2.30	1.00	0.88	0.36	1.11	1.83	1.00	0.77	0.63			
14	a	0.47	0.92	0.40	0.35	0.14	0.42	0.69	0.38	0.30	0.20	0.06	0.01	0.09
	b	1.18	2.30	1.00	0.88	0.35	1.10	1.82	1.00	0.79	0.53			
17	a	0.31	0.58	0.25	0.19	0.11	0.43	0.70	0.38	0.31	0.25	0.07	0.01	0.09
	b	1.24	2.32	1.00	0.76	0.44	1.13	1.84	1.00	0.82	0.66			
25	a	0.14	0.26	0.11	0.10	0.06	0.09	0.17	0.08	0.06	0.05	0.01	-	0.03
	b	1.27	2.36	1.00	0.91	0.55	1.13	2.13	1.00	0.75	0.63			
30	a	0.13	0.24	0.11	0.09	0.06	0.09	0.13	0.08	0.06	0.05	0.01	-	0.03
	b	1.18	2.18	1.00	0.82	0.55	1.13	1.63	1.00	0.75	0.63			
35	a	0.07	0.15	0.06	0.05	0.07	0.08	0.11	0.07	0.05	0.06	0.01	-	0.01
	b	1.16	2.50	1.00	0.83	1.16	1.14	1.57	1.00	0.71	0.86			

(Fortsetzung Seite 91)

43	a	0.03	0.06	0.03	0.03	0.06	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	0.01	-	0.01
	b	1.00	2.00	1.00	1.00	2.00	1.00	1.33	1.00	1.00	1.00			
52	a	0.05	0.08	0.03	0.05	0.07	0.08	0.10	0.05	0.08	0.10	0.01	-	0.02
	b	1.66	2.66	1.00	1.66	2.33	1.60	2.00	1.00	1.60	2.00			
64	a	0.02	0.05	0.01	0.05	0.05	o	o	o	o	o	o	o	o
	b	2.00	5.00	1.00	5.00	5.00								
80	a	-	-	-	0.02	-	o	o	o	o	o	o	o	o
101	a	-	-	-	0.09	-	o	o	o	o	o	o	o	o
106	a	-	-	-	0.06	-	o	o	o	o	o	o	o	o

Tabelle 32. Untersuchung der HF-Fraktionen der Zellwand nach Trennung auf Sephadex G 25 und G 50 (µMol/ml)

Nebenmaximum III wird möglicherweise aus einer Mischung von 2 Monomeren (N-Ac-GlcN, N-Ac-TalNU, 2 bzw. 3 Glu, 2 Ala, 1 Lys) mit einem Molekurlargewicht von 966 bzw. 1095 gebildet, denn in Fraktion 17 steigt das Verhältnis von Glu zu Lys auf 2.5 und die Fraktion 32 entspricht der Position von UDP-MurNAC-Pentapeptid mit einem Molekulargewicht von 1149.

Ein weiterer Peak, (IV) der die Fraktionen 46 - ca. 68 umfaßt, entspricht der Position von UDP-MurNAc mit einem Molekulargewicht von 679. Ein Tripeptid (N-Ac-GlcN, N-Ac-TalNU, 1Glu, 1 Ala, 1 Lys) hat ein Molekulargewicht von 766. Möglicherweise enthält dieser Peak neben dem Tripeptid noch weitere Bruchstücke von dieser Größe, denn in Fraktion 64 steigt das Verhältnis GlcN/Lys auf 5, das nicht die Verhältnisse im intakten Sacculus wiedergibt. Die Bruchstücke sind wahrscheinlich auf eine geringe unspezifische Hydrolyse zurückzuführen.

Die 3 restlichen untersuchten Fraktionen enthielten nur noch GlcN. Auf das Vorkommen von TalNU wurde nicht geprüft.

Aus diesen Ergebnissen kann man den Schluß ziehen, daß die HF-Behandlung Untereinheiten freisetzt, die möglicherweise die gleiche Zusammensetzung wie die biosynthetisch gebildeten Vorstufen haben, in ihrer Struktur sich aber wegen der gemischten Disaccharide von diesen unterscheiden. Einen Strukturvorschlag für ein Dimeres zeigt Abb. 10.

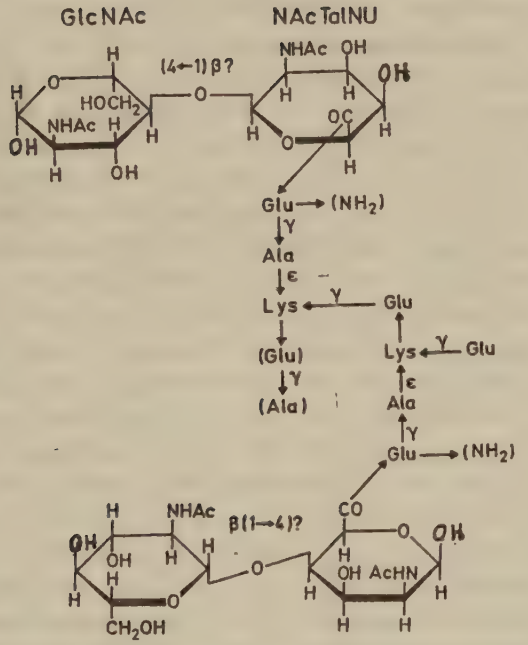


Abb.: 10 . Strukturvorschlag von einem HF-Bruckstück (Dimeres)

4. DISKUSSION

Grundaufbau und Modifikationen der Zellwand der Gattung Methanobacterium

Die 10 untersuchten Vertreter der Gattung Methanobacterium haben alle einen festen Zellwandsacculus als formgebende Komponente. Die chemische Analyse ergab, daß der Sacculus aus Glycansträngen zusammengesetzt ist, die über kurze Peptidketten quervernetzt sind. Die Glycanstränge werden bei M. thermoautotrophicum von N-Ac-D-GlcN und N-Ac-TalNU gebildet, die β-glycosidisch 1,3 oder 1,4 verbunden sind. Die Peptide bestehen aus einem Satz von 3 Aminosäuren Glu: Ala: Lys = 2.3 : 1.2 : 1.0. Die Aminosäuren besitzen alle die L-Konfiguration. Das Peptid ist über die Aminogruppe der Glutaminsäure mit der TalNU verbunden. Ester- oder Amidbindungen wie sie in Glycoproteinen üblich sind, konnten durch NaOH-Behandlung und Ammonolyse ausgeschlossen werden. Ob freie Carboxylgruppen der Glutaminsäure amidiert sind, konnte durch Partialhydrolyse nicht entschieden werden, da auch TalNU hydrolyselabil ist und leicht Ammoniak abgibt.

Nach Woese et al. 1978 wird die Gattung Methanobacterium in 2 Gruppen eingeteilt (Abb. 11). Zur Gruppe IA gehören M. arbophilicum, M.spec. AZ, sowie M. ruminantium M1 und PS.

M. arbophilicum und M. spec. AZ besitzen nur GalN in etwa äquimolarer Menge wie Lysin im Sacculuspolymer. Obwohl ca. 4% Phosphat gefunden wurden, kann GalN nicht mit HF entfernt oder mit Perjodat zerstört werden. Es ersetzt daher GlcN im Sacculuspolymer. Nach den bisherigen Ergebnissen der Zellwandanalysen lassen sich beide Arten, die auch auf Grund der 16 sRNA-Analyse nahe verwandt sind, nicht unterscheiden.

Bei M. ruminantium M1 kommen sowohl GalN als auch GlcN vor, jedoch zusammen in erheblich größerer Menge als Lysin. GlcN läßt sich mit HF bei 0°C entfernen, ohne daß der Sacculus zerstört wird. Unter diesen Bedingungen werden Phosph.. diesterbindungen hydrolysiert. Weiterhin wird es mit Perjo-

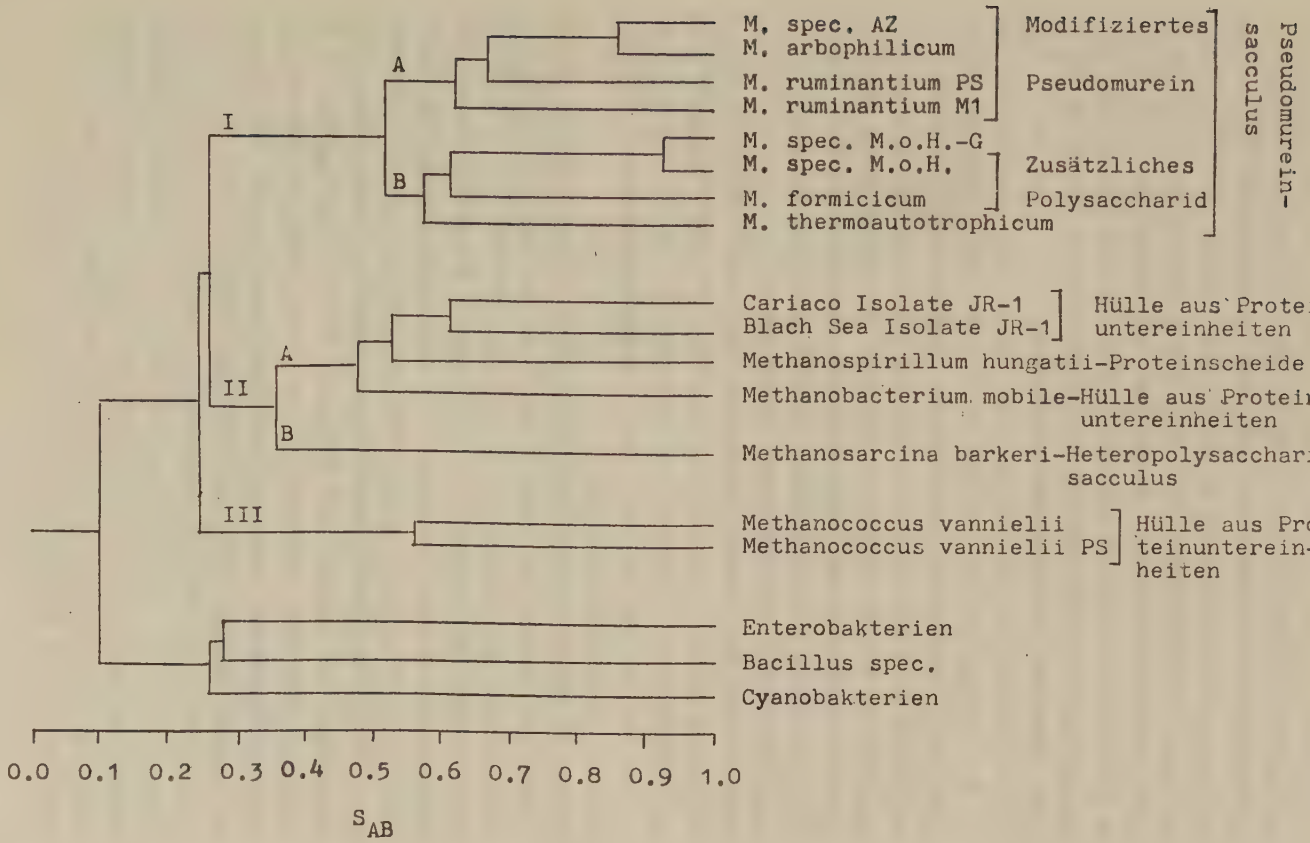


Abb. 11. Dendrogramm der methanogenen Bakterien auf Grund des 16 sRNA-Homologievergleiches (nach Woese) und die Verteilung der Zellwandkomponenten

dat zerstört. Daher nimmt auch bei M. ruminantium M1 GalN die Position von GlcN ein. GlcN kommt, verbunden über Phosphodiesterbindungen, entweder als Einzel- oder als Oligosaccharidsubstituent des Sacculuspolymers vor. Mit diesem Ergebnis stimmt auch der gefundene Phosphatgehalt von ca. 4% überein. M. ruminantium M1 kann weiterhin durch den teilweisen oder völligen Ersatz von Alanin durch Threonin von allen anderen Arten abgetrennt werden.

M. ruminantium PS besitzt ebenfalls beide Aminozucker, aber einen wesentlich niedrigeren Phosphatgehalt von ca. 1%. Weder GalN noch GlcN können mit HF bei 0°C entfernt werden. Da die Summe beider Aminozucker der Lysinmenge entspricht, kommen beide möglicherweise nebeneinander im Sacculusglycan vor. Das Vorhandensein von Ornithin neben Lysin wurde nur bei M. ruminantium PS gefunden.

Die Arten der Gruppe IA enthalten auch Rhamnose in der Zellwand. Dagegen enthalten die Arten der anderen Gruppen nur Spuren.

Die Gruppe IB kann nach der Zellwandanalyse in 3 Untergruppen eingeteilt werden.

Zur Untergruppe IB_1 gehören M. spec. M.o.H. und M. formicicum. Sie enthalten jeweils beide Aminozucker, aber in unterschiedlichen Mengen. M. formicicum enthält die doppelte Menge und M. spec. M.o.H. die 1,7-fache Menge wie Lysin.Die Aminozucker konnten nicht mit HF entfernt werden, was auch mit dem im Gegensatz zu der Gruppe IA niedrigen Phosphatgehalt dieser Gruppe übereinstimmt. Außerdem haben beide Species über 10% zusätzliche Neutralzuckerpolysaccharide in der Zellwand. Ob GalN und GlcN beide alternierend im Sacculuspolymer vorkommen oder zwei verschiedene Glycane bilden, muß durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Die Untergruppe IB_2 bilden M. thermoautotrophicum und M. spec. M.o.H.-G. Beide enthalten nur GlcN, höchstens geringe Mengen an GalN, in der Zellwand. Während M. thermoautotrophicum GlcN in größerer Menge als Lysin enthält, liegen die GlcN-Werte bei M.spec. M.o.H.-G unter denen von Lysin.

M. spec. M.o.H.-G besitzt im Gegensatz zu M. thermoautotrophicum Mannose als zusätzlichen Neutralzucker. Eine weitere Differenzierung ist auf Grund der Zellwandanalyse nicht möglich.

Die 3. Untergruppe enthält 2 thermophile Stämme, M. thermoautotrophicum Stamm Marburg und M. spec. Beide besitzen GalN und GlcN. Aber im Unterschied zu M. formicicum und M. spec. M.o.H. stellt GalN den Hauptanteil der Aminozucker. GalN kommt etwa äquimolar zu Lysin vor und bildet wohl wie bei M. arbophilicum und M. ruminantium M1 den Aminozucker des Glycanstranges.

Weitere Untersuchungen müssen die Frage klären, ob die Aminozuckerzusammensetzung genetisch fixiert ist oder ob ein Austausch unter dem Einfluß von unterschiedlichen Kulturbedingungen stattfindet, wie es für einige Aminosäuren des Mureins nachgewiesen wurde (Hammes 1972). Damit hängt auch die Frage zusammen, ob M. thermoautotrophicum und M. thermoautotrophicum Stamm Marburg 2 verschiedene Arten sind. Denn bisher konnten zur Unterscheidung dieser Arten von den übrigen Arten nur ihre Morphologie und die Wachstumsbedingungen herangezogen werden.

Das Murein der Eubakterien und das "Pseudomurein" der Gattung Methanobacterium

Abb.: 12 zeigt die Struktur des Mureins und Abb. 13 Struktur des Pseudomureins (Dimer).

Beide Strukturen zeigen Ähnlichkeiten aber auch wesentliche Unterschiede. In beiden Fällen wird die Zellwand von Glycansträngen gebildet, die über Peptidketten verbunden sind. Beide Glycane enthalten Glucosamin. Aber der Glycanstrang von Methanobacterium besitzt keine Muraminsäure. Ihre Position wird von einer Hexosaminuronsäure, die als Talosaminuronsäure identifiziert wurde, eingenommen.

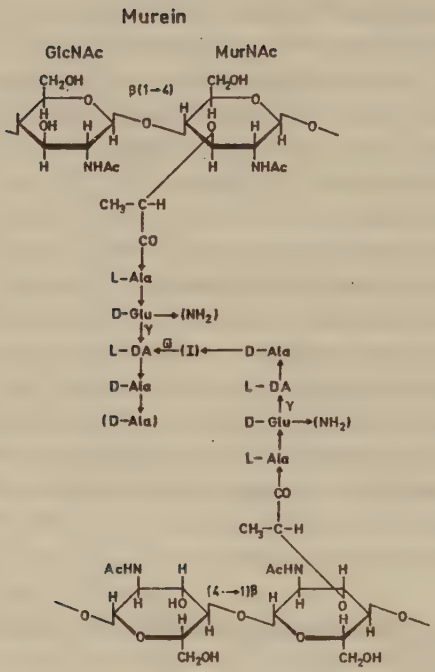


Abb.: 10. Struktur des Mureins (Dimer)
(Schleifer und Kandler 1972)

Bisher waren 5 Hexosaminuronsäuren aus Bakterien- oder Pilz-Polymeren isoliert worden (Perkins 1963; Mayer 1969; Torii et al. 1973; Reistadt 1974; Jeanes et al. 1971; Kontrohr 1977). Jedoch nur noch bei Halococcus (Steber 1976) auch als Strukturkomponente des Zellwandsacculus. TalNU wurde in der Natur erstmals bei methanogenen Bakterien nachgewiesen.

In beiden Fällen sind die Aminogruppen N-acetyliert und die Verknüpfung ist β-glycosidisch. Die Kettenlänge beträgt jeweils 60 -100 Disaccharide.

Gemeinsam ist auch ein Satz von 3 Aminosäuren. Unterschiede bestehen in den Molverhältnissen. Beim Murein beträgt das Verhältnis Glu: Ala: Lys = 1.0:2.0:1.0, bei Methanobacterium Glu:Ala:Lys = 2.3:1.2:1.0. In beiden Fällen bildet eine Diaminosäure die Verbindungsstelle zweier Monomeren. Während jedoch beim Murein L- und D-Aminosäuren abwechselnd vorkommen, gibt es hier nur L-Aminosäuren in γ- und ε-Bindungen.

Diese Tatsache bewirkt eventuell die Stabilität gegen die üblichen Proteasen, während sie beim Murein auch auf die alternierende Folge von L- und D-Aminosäuren zurückgeführt wird.

Auch scheint die Aktivierungsenergie zur Vernetzung zweier Monomeren aus der Abspaltung von Alanin gewonnen zu werden. Denn es wurde ein erhöhter Alaningehalt im Nährmedium gefunden (Thauer, pers. Mitteilung; Zehnder und Wuhrmann 1977; Wellinger und Wuhrmann 1977).

Die Biosynthese erfolgt wie beim Murein über UDP-aktivierte Vorstufen (unveröffentlichte Ergebnisse).

Antibiotika-Studien von Hammes et al. (1979) zeigten bei Methanobacterium eine Resistenz gegen alle Antibiotika, die gegen die Biosynthese oder den Einbau der Peptideinheit gerichtet sind, was auch durch die verschiedene Struktur erklärt werden kann. Sensitivität wurde aber gegenüber solchen Antibiotica festgestellt, die an lipid-aktivierten Vorstufen angreifen oder die Polymerisation des Glycanstranges ver-

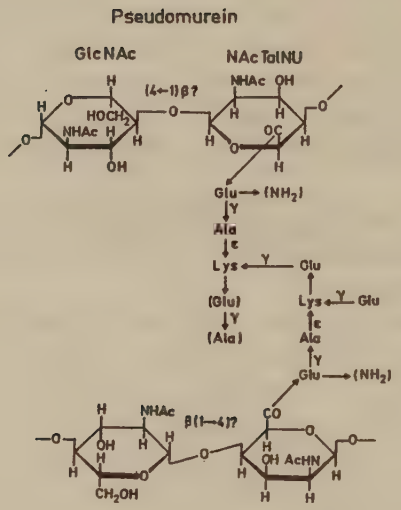


Abb.: 13. Struktur des Pseudomureins (Dimer)

hindern. Daher ist anzunehmen, daß auch bei Methanobacterium eine lipid-gebundene Vorstufe bei der Biosynthese beteiligt ist.

Wegen der Ähnlichkeiten zum Murein (Weidel 1964) der Eubakterien schlug Kandler für die Zellwandkomponente der Gattung Methanobacterium die Bezeichnung Pseudomurein vor.

Die "Zellwandtypen" der methanogenen Bakterien und ihre systematische Bedeutung

Die Bedeutung der "Zellwandtypen" der methanogenen Bakterien für das Verständnis der Evolution wurde von Kandler (1979) bereits eingehend diskutiert.

Auf Grund der Untersuchung der 16 sRNA stellen die methanogenen Bakterien keine einheitliche Gruppe dar. Man kann sie in 3 größere Zweige unterteilen, die sich schon zu einer Zeit getrennt haben, als sich Eubakterien und Cyano-

bakterien trennten.

Alle im Dendrogramm aufgeführten Arten wurden von uns auf das Vorkommen eines Zellwandsacculus untersucht.

Nur die Gruppe I hat eine analoge Entwicklung der Zellwand durchgemacht wie die Eubakterien und ein Sacculuspolymer, das Pseudomurein, entwickelt.

Die Gruppe II ist im Bezug auf ihre äußere Zellhülle heterogener. 3 verschiedene Wege wurden eingeschlagen. Wie schon früher beschrieben (Hippe und Kandler 1977) hat Methanosarcina barkeri ein Heteropolysaccharid entwickelt, das aber im Gegensatz zu dem von Halococcus (Steber und Schleifer 1975) nicht sulfatisiert ist. Nach der 16 sRNA-Ähnlichkeit sind Halococcus und auch Halobacterium näher mit Methanobacterium als mit Methanosarcina verwandt. Für eine solche Verwandtschaftsbeziehung spricht auch das Ergebnis der Zellwandanalyse. Denn Halococcus (Steber 1976) und Methanobacterium sind die einzigen bekannten Bakterienarten, bei denen eine Hexosaminuronsäure als Strukturkomponente des Zellwandsacculus vorkommt.

Methanospirillum hungatii hat eine Proteinscheide als äußerste Zellschicht, die aus 18 Aminosäuren aufgebaut ist, (Kandler und König 1978), entwickelt. Die isolierten Scheiden enthalten auch Neutralzucker. Im Gegensatz zu den anderen Methanbakterien, die nur Hexosen als zusätzliche Neutralzucker enthalten, befindet sich darunter auch Arabinose.

Die übrigen Arten der Gruppe II und auch der Gruppe III besitzen keine Sacculi oder Scheiden, sondern eine Schicht aus Proteinuntereinheiten wie auch Halobacterium, bei dem ein Glycoprotein gefunden wurde (Mescher und Strominger 1978). Das Wachstum von Methanococcus vannielii wird durch Bacitracin gehemmt (Johnes et al. 1977). Da bei der Biosynthese von Glycoproteinen beim Einbau des Glycananteils eine lipidaktivierte Vorstufe beteiligt ist, könnte auch M. vannielii ein Glycoprotein besitzen.

Methanobacterium mobile, das früher zur Gattung Methanobacterium gestellt wurde , muß wohl nach der 16 sRNA-Analyse wie auch nach den Zellwanduntersuchungen von der Gattung Methanobacterium abgetrennt werden.

Die Ergebnisse der Zellwandanalysen unterstützen somit die Vorstellung von Woese et al. (1978), die Methanbakterien zusammen mit den übrigen Archaebakterien als einen eigenen Zweig zu betrachten, der sich schon früh in der Evolution von den Eubakterien abtrennte.

Diesen Vorstellungen zufolge ist der Mureinsacculus der Eubakterien erst nach dieser Trennung entwickelt worden. Dem Mureinsacculus liegt ein Grundbauplan zu Grunde, der lediglich Variationen erfahren hat.

Dagegen haben die methanogenen Bakterien zu unterschiedlichen Zeiten nach dieser Trennung gänzlich verschiedene Polymere entwickelt. Nur die Gattung Methanobacterium hat analog dem Mureinsacculus einen Pseudomureinsacculus entwickelt.

Hexosaminuronsäuren sind bei Archaebakterien, bei Eubakterien und auch bei Eucaryonten gefunden worden. Die Hexosaminuronsäuren sind somit möglicherweise ein Hinweis auf eine gemeinsame Entwicklung dieser 3 Gruppen in früher Zeit. Während nun Methanobacterium eine Hexosaminuronsäure als Baustein des Zellwandsacculus verwendet hat, wurde bei den Eubakterien Muraminsäure neu entwickelt und als Sacculusbaustein verwendet. Die Aminuronsäuren sind nur noch als "Reste" in anderen Polymeren der Zellwand der Eubakteria zu finden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Von allen bekannten Species der Gattung Methanobacterium konnten Zellwandsacculi isoliert werden. Sie besitzen die Form der intakten Zellen, wie elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen. Die Sacculi sind resistent gegen die üblichen Proteasen und Glycosidasen. Durch einfache Extraktionsmethoden konnten sie nicht in Bruchstücke zerlegt werden.

Die Zellwandsacculi zeigen bei allen untersuchten Stämmen im wesentlichen den gleichen Aufbau. Modifikationen kommen vor. In Hydrolysaten wurden 3 Aminosäuren, Alanin (Threonin), Glutaminsäure und Lysin (Ornithin), sowie 1 oder 2 Aminozucker (GalN und GlcN) nachgewiesen. Die Aminosäuren besitzen die L-Konfiguration, GlcN die D-Konfiguration. Muraminsäure fehlt. Ihre Position wird von einer Hexosaminuronsäure eingenommen, die als Talosaminuronsäure identifiziert wurde. Sie wurde bisher noch nicht in der Natur gefunden.

Zusätzlich wurden in unterschiedlichen Mengen Neutralzucker nachgewiesen, die aber extrahierbar sind und somit keine Strukturkomponenten des Sacculus bilden.

Der Aschegehalt beträgt 8 - 15 %. Ein Phosphatgehalt über 1% wurde nur bei M. ruminantium M1 und M. arbophilicum gefunden. Der Sulfatgehalt ist niedrig, so daß kein sulfatisiertes Polymer anzunehmen ist.

Die Struktur des Peptidanteils wurde durch Isolierung überlappender Peptide nach Partialhydrolyse aufgeklärt. Durch Behandlung der Sacculi mit NaOH oder Hydrazin konnten Glycanstränge von etwa 68 Disaccharideinheiten mit einem je nach Inkubationsdauer unterschiedlichen Restaminosäureanteil isoliert werden.

Durch Inkubation mit 70% HF bei 30°C wurden lösliche Zellwandfraktionen erhalten, die im Vergleich zur intakten Zellwand unveränderte C- und N-Termini der Aminosäuren zeigten. Es handelt sich vermutlich um Dimere, bestehend aus 2 Disac-

chariden und dem sie verbindenden Peptidanteil, die aus der Quervernetzung benachbarter Stränge hervorgehen.

Auf Grund dieser Ergebnisse, die größtenteils an der Zellwand von M. thermoautotrophicum gewonnen wurden, wurde ein Strukturvorschlag gemacht.

Es bestehen einerseits Ähnlichkeiten zum Murein der Eubakterien, wie das Vorhandensein eines Glycanstranges, der über eine Peptidkomponente vernetzt ist, aber auch Unterschiede wie der Ersatz der Muraminsäure durch Talosaminuronsäure und das Fehlen von D-Aminosäuren.

Daher wurde für den Zellwandsacculus der Gattung Methanobacterium die Bezeichnung "Pseudomurein" vorgeschlagen (Kandler 1969).

Die durch neuere Untersuchungen gefundene Sonderstellung der methanogenen Bakterien findet somit auch im Zellwandaufbau ihre Bestätigung.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Abram, J. W., and Nedwell, D.B., (1978). Inhibition of methanogenesis by sulfate reducing bacteria competing for transferred hydrogen. Arch. Microbiol. 117,89 - 92.

Albersheim, P., Nevins, D.J., English, P.D., and Karr, A., (1967). A method für the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. Carboh. Res. 5, 340 - 345.

Amons, R., van Agthoven, A., Pluijms, W., Möller, W., Higo, K., Itoh, T., and Osawa, S., (1977). A comparison of the aminoterminal sequence of the L 7 / L 12 - type Proteins of Artemia salina and Saccharomyces cerevisiae. FEBS Letters 81, 308 - 310.

Baader, W., Dohne, E., und Brenndörfer, M., (1978). Biogas in Theorie und Praxis. KTBL-Schriften-Vertrieb im Landwirtschaftsverlag GmbH, Münster-Hiltrup.

Baddiley, J., Buchanan, J.G., Handschumacher, R.E., Prescott, J.F., (1956). Chemicals studies in the biosynthesis of purine nucleotides. Part. I. The preparation of N-glycylglycosyl-amines. J.chem.Soc. , 2818 - 2823.

Baddiley, J., and Davison, A.L., (1961). The occurence and location of teichoic acid in lactobacilli. J. gen. Microbiol. 24, 295 - 299.

Baer, H. H., (1969). Oligosaccharides. In: The amino sugars. pp. 267 - 373, (R. W. Jeanloz, ed.), Academic Press, New York and London.

Bailey, J.L., (1962). Techniques in protein chemistry. Elsevier-Publishing Company, Amsterdam-London-New York.

Balch, W.E., und Wolfe, R.S., (1976). New approach to the cultivation of methanogenic bacteria: 2-mercaptoethanesulfonic acid (HS-CoM)-dependent growth of Methanobacterium ruminantium in a pressurized atmosphere Appl. Environ. Microbiol. 32, 781 - 791.

Balch, W. E., Magrum, L.J., Fox, G.E., Wolfe, R. S., and Woese, C. R., (1977). An ancient divergence among the bacteria. J. Mol. Evol. 9, 305 - 311.

Balch, W. E., Magrum, L. J., Fox, G. E., Woese, C. R., and Wolfe, R. S., (1979). Ann. Rev. Bacteriol. in press.

Balderston, W. L., and Payne, W. J., (1976). Inhibition of methanogenesis in salt marsh sediments and whole-cell suspensions of methanogenic bacteria by nitrogen oxides. Appl. Environ. Microbiol. 32, 264 - 269.

Barker, H. A., (1936a). On the biochemistry of the methane fermentation. Arch. Microbiol. 7, 404 - 419.

Barker, H. A., (1936b). Studies upon the methane-producing bacteria. Arch. Mikrobiol. 7 420 - 438.

Barker, H. A., (1956). Biological formation of methane. In: Bacterial Fermentations, pp. 1- 27, J. Wiley and Sons, Inc. New York.

Bergey, D.H., (1934). Manual of Determinative Bacteriology, 4 th Edition, Williams & Wilkins Co., Baltimore.

Bergey, D. H., (1957). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7 th Edition, Williams & Wilkins Co., Baltimore.

Bergmeyer, H. U., (1974). Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim.

Best, A. N., (1978). Composition and characterization of tRNA from methanococcus vannielii. J. Bacteriol. 133, 240 - 250.

Birnbaum, S. M., Levintow, L., Kingsley, R. B., and Greenstein, J. P., (1952). Specificity of amino acid acylases. J. biol. Chem. 194, 455 - 470.

Blaylock, B. A., and Stadtman, T. C., (1966). Methane biosynthesis by Methanosarcina barkeri. Properties of the soluble enzyme system. Arch. Biochim. Biophys. 116, 139 - 158.

Bligh, E. G., and Dryer, W. J., (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911.

Blumenkrantz, N., and Asboe-Hansen, G., (1973). A new method for quantitative determination of uronic acids. Anal. Biochem. 54, 484 - 489.

Boas, N. F., (1953). A method for the determination of hexosamines in tissues. J. Biol. Chem. 204, 553 - 563.

Brock, T. D., (1974). Sulfolobus. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th Ed. pp. 461, 462, (R. E. Buchanan and N. E. Gibbons, eds.), Williams and Wilkins Co., Baltimore.

Bryant, M. P., Wolin, E. A., Wolin, M. J., and Wolfe, R. S., (1967). Methanobacillus omelianskii, a symbiotic association of two species of bacteria. Arch. Microbiol. 59, 20 - 31.

Bryant, M. P., Mc Bride, B. C., and Wolfe, R. S., (1968). Hydrogen-oxidizing methane bacteria. J. Bacteriol. 95, 1118 - 1123.

Bryant, M. P., (1974). Methane-producing bacteria. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8 th Ed. pp. 472 - 477, (R. E. Buchanan and N. E. Gibbons, eds.) Williams & Wilkins Co., Baltimore.

Bryant, M. P., Campbell, L. L., Reddy, C. A., and Crabill, M. R., (1977). Growth of Desulfovibrio in lactate or ethanol media low in sulfate in association with H_2 - utilizing methanogenic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 33, 1162 - 1169.

Buchanan, B. B. Schuman, P., and Shanmugam, K. T., (1972). Role of reductive carboxylic acid cycle in a photosynthetic bacterium lacking ribulose 1,5-diphosphate carboxylase. Biochim. Biophys. Acta 283, 136 - 145.

Chatterjee, A. N., (1969). Use of bacteriophage-resistent mutants to study the nature of the bacteriophage receptor site of Staphylococcus aureus. J. Bacteriol. 98, 519 - 527.

Cheeseman, P., Toms-Wood, A., and Wolfe, R. S., (1972). Isolation and properties of a fluorescent compound, factor $_{420}$, from Methanobacterium strain M.o.H. J. Bacteriol. 112, 527 - 531.

Chen, P. S., Toribara, T. Y., and Warner, H., (1956). Microdetermination of phosphorus. Anal. Chem. 28, 1756 - 1758.

Chen, M., and Wolin, M. J., (1977). Influence of CH_4 production by Methanobacterium ruminantium on the fermentation of glucose and lactate by Selenomonas ruminantium. Appl. Environ. Microbiol. 34, 756 - 759.

Chibnall, A. C., and Rees, M. W., (1951). The amide and free carboxyl groups of insulin. Biochem. J. 48, XLV ii.

Clotten, R., und Clotten, A., (1962). Hochspannungselektrophorese, Thieme-Verlag, Stuttgart.

Doddema, H. J., Hutten, T. J., van der Drift, C., and Vogels, G. D., (1979). ATP hydrolysis and synthesis by the membrane-bound ATP synthase complex of Methanobacterium thermoautotrophicum. J. Bacteriol. 136, 19 - 23.

Dodgston, K. S., and Price, R. G., (1962). A note on the determination of the ester sulfate content of sulphated polysaccharides. Biochem. J. 84, 106 - 110.

Douglas, C., und Achatz, F., (1979). Elektrophoretische Charakterisierung von Ribosomen methanogener Bakterien. Poster, Tagung der Sektion I der DGHM, München.

Eirich, L. D., Vogels, G. D., and Wolfe, R. S., (1978). Proposed structure of coenzyme F_{420} from Methanobacterium. Biochem. 17, 4583 - 4593.

Edwards, T., and Mc Bride, B. C., (1975). New method for the isolation and identification of methanogenic bacteria. Appl. Microbiol. 29, 540 - 545.

Ferry, J.G., Smith, P.H., and Wolfe, R.S., (1974). Methanospirillum, a new genus of methanogenic bacteria, and characterization of Methanospirillum hungatii sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 24, 465 - 469.

Fox, G. E., Magrum, L. J., Balch, W. E., Wolfe, R. S., and Woese, C.R., (1977). Classification of methanogenic bacteria by 16 S ribosomal RNA characterization. Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 4537 - 4541.

Fraenkel-Conrat, H., and Chun, Ming Tsung (1967). Hydrazinolysis. In: Methods in Enzymology, vol. XI, pp. 151 - 155, (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, eds.), Academic Press Inc., London and New York.

Freundt, E.A., (1974). Mycoplasmatales. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th Ed. pp. 930 - 952, (R. E. Buchanan and N. E. Gibbons, eds.) Williams & Wilkins Co., Baltimore.

Fuchs, G., and Stupperich, E., (1978). Evidence for an incomplete reductive carboxylic acid cycle in Methanobacterium thermoautotrophicum. Arch. Microbiol. 118, 121 - 125.

Fuchs, G., Stupperich, E., and Thauer, R. K., (1978a). Acetate assimilation and the synthesis of alanine, aspartate and glutamate in Methanobacterium thermoautotrophicum. Arch. Microbiol. 117, 61 - 66.

Fuchs, G., Stupperich, E., and Thauer, R. K., (1978b). Function of fumerate reductase in methanogenic bacteria (Methanobacterium) . Arch. Microbiol. 119, 215 - 218.

Fukuda, M., Muramatsu, T., and Egami, F., (1969). β-Xylosidase from the liver of Charonia lampas. J. Biochem. 65, 191 - 199.

Ghuysen, J. M., Tipper, D. J., and Strominger, J. L., (1966). Enzymes that degrade bacterial cell walls. In: Methods in Enzymology, vol. VIII, pp. 685 - 699, (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, eds.), Academic Press Inc., London and New York.

Ghuysen, J. M., Bricas, E., Leyh-Bouille, M., Lache, M., Shockman, G. D., (1967). The peptide N- (L-alanyl-D-iso-glutaminyl)-N-(D-isoasparaginyl)-L-lysyl-D-alanine and the disaccharide N-acetylglucosaminyl-β-1,4-N-acetylmuramic acid in cell wall peptidoglycan of Streptococcus faecalis strain ATCC 9790. Biochem. 6, 2677 - 2719.

Ghuysen, J. M., Bricas, E., Lache, M., and Leyh-Bouille, M., (1968). Structure of the cell wall of Micrococcus lysodeikticus. III. Isolation of a new peptide dimer, Nα (L-alanyl-γ- (α-D- glutamyl-glycine)) -L-lysyl-D-alanyl-Nε (L-alanyl-γ- (α-D-glutamyl-glycine))-L-lysyl-D-alanine.Biochem. 7, 1450 - 1460.

Gibbons, N. E., (1974). Halobacteriaceae. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Ed. pp. 269-273, (R. E. Buchanan and N. E. Gibbons, eds.), Williams & Wilkins Co., Baltimore.

Gottschalk, A., Murphy, W.H., and Graham, E.R.B., (1962) Carbohydrate-peptide linkages in glycoproteins and methods for their elucidation. Nature 194, 1051 - 1053.

Grado, C., and Ballou, C.E., (1961). Myo-inositol phosphates obtained by alkaline hydrolysis of beef brain phosphoinositide. J. Biol. Chem. 236, 54 - 60.

Graßmann, W., Hörmann, H., und Endres, H., (1955) Untersuchungen über die Anwendbarkeit der Reduktionsmethode zur Bestimmung carboxylendständiger Aminosäuren in Peptiden und Proteinen. Chem. Ber. 88, 102 - 117.

Gunsalus, R.P., and Wolfe, R. S., (1978a). Chromophoric factors F_{342} and F_{430} of Methanobacterium thermoautotrophicum. FEMS Microb. Lett. 3, 191 - 193.

Gunsalus, R. P., and Wolfe, R. S., (1978b). ATP activation and properties of the methyl Coenzyme M reductase system in Methanobacterium thermoautotrophicum. J. Bact. 135, 851 - 857.

Hammes, W., (1972). Dissertation, München.

Hammes, W.P., Winter, J., and Kandler, O., (1979). The sensitivity of the pseudomurein-containing genus Methanobacterium to inhibitors of murein synthesis. Arch. Microbiol. in press.

Herbert, D., Phipps, P. J., and Strange, R. E., (1971). Chemical analysis of microbial cells. In: Methods in Microbiology, vol. 5 B, pp. 209 - 344. (J. R. Norris and D. W. Ribbons, eds.), Academic Press, London-New-York.

Hestrin, S., (1949). The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine and its analytical application. J. Biol. Chem. 180, 249 - 261.

Höcht, H., Martin, H. H., und Kandler, O., (1965). Zur Kenntnis der chemischen Zusammensetzung der Zellwand der Blaualgen. Z. Pflanzenphysiol. 53, 39 - 57.

Hoppe-Seyler, F., (1886). Über die Gärung der Cellulose mit Bildung von Methan und Kohlensäure. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 10, 401 - 440.

Hoppe-Seyler, F., (1887). Die Methangärung der Essigsäure. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 11, 561 - 568.

Horton, D., (1969). Monosaccharide amino sugars. In: The amino sugars. pp. 1 - 211, (R.W. Jeanloz, ed.), Academic Press, New York and London.

Hungate, R. E., (1950). The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. Bacteriol. Rev. 14, 1 - 49.

Hungate, R. E., (1969). A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: Methods in Microbiology, vol. 3 B, pp. 117 - 132, (J. R. Norris and D. W. Ribbons, eds.), Academic Press, London-New York.

Ito, E., and Strominger, J.L., (1964). Enzymatic Synthesis of the peptide in bacterial uridine nucleotides. J. Biol. Chem. 239, 210 - 214.

Jeanes, A., Burton, K. A., Cadmus, M. C., Knutson, C.A., Rowin, G.L., and Sandfort, P.A., (1971). Extracellular black yeast polysaccharide composed of N-acetyl glucosamine and N-acetyl-glucosaminuronic acid. Nature New Biology 233, 259 - 260.

Johnson, A. R., (1971). Improved method of hexosamine determination. Anal. Biochem. 44, 628 - 635.

Jones, J. B., Bowers, B., and Stadtman, T. C., (1977). Methanococcus vannielii: Ultrastructure and sensitivity to detergents and antibiotics. J. Bacteriol. 130, 1357 - 1363.

Kandler, O., and Hippe, H., (1977). Lack of peptidoglycan in the cell walls of Methanosarcina barkeri. Arch. Microbiol. 113, 57 - 60.

Kandler, O., and König, H., (1978). Chemical composition of the peptidoglycan-free cell walls of methanogenic bacteria. Arch. Microbiol. 118, 141 - 152.

Kandler, O., (1979). Zellwandstrukturen bei Methan-Bakterien. Zur Evolution der Procaryonten. Naturwissenschaften 66, 95 - 105.

Kantor, T.G., and Schubert, M., (1957). A method for the desulfation of chondroitin sulfate. J. Amer.Chem.Soc. 79, 152.

Kato, K., and Strominger, J.L., (1968). Structure of the cell wall of Staphylococcus aureus IX. Mechanism of hydrolysis by the L_{11} enzyme. Biochem. 7, 2754 - 2761.

Kawanishi, Y., Iwai, K., and Ando, T., (1964). Determination of C-terminal arginine and asparagine of proteins by catalytic hydrazinolysis. J. Biochem. 56, 314 - 324.

Kidby, D. K., and Davidson, D. J., (1973). A convenient ferricyanide estimation of reducing sugars in the nanomole range. Anal. Biochem. 55, 321 - 325.

Kluyver, A.J., and van Niel, C.B., (1936) Prospects for a natural system of classification of bacteria. Zentralblatt für Bakt. II Abt. 94, 384 - 403.

Kontrohr, T., (1977). The identification of 2-amino-2-deoxy-L-altruronic acid as a constituent of Shigella sonnei phase I lipopolysaccharide. Carboh. Res. 58, 498 - 500.

Langenberg, K.F., Bryant, M. P., and Wolfe, R. S., (1968). Hydrogen-oxidizing methane bacteria II. Electon microscopy. J. Bacteriol. 95, 1124 - 1129.

Larson, D. M., Setsinger, D. C., and Waibel, P. E., (1971). Procedure for the determination of D-amino acids. Anal. Biochem. 39, 395 - 401.

Latham, M. J., and Wolin, M. J., (1977). Fermentation of cellulose by Ruminococcus flavefaciens in the presence and absence of Methanobacterium ruminantium. Appl. Environ. Microbiol. 34, 297 - 301.

Lehmann, K. B., und Neumann, R. O., (1927). Bakteriologische Diagnostik. 7. Auflage, Lehmann's Verlag, München.

Mah, R. A., Ward, D.M., Baresi, L., and Glass, T. L., (1977) Biogenesis of methane. Ann. Rev. Microbiol. 31, 309 - 341.

Mah, R. A., Smith, M. R., and Baresi, L., (1978). Studies on an acetate-fermenting strain of Methanosarcina.Appl. Environ. Microbiol. 35, 1174 - 1184.

Makula, R. A., and Singer, M. E., (1978). Ether-containing lipids of methanogenic bacteria. Biochem. Biophys. Res. Commun. 82, 716 - 722.

Mayer, H., (1969). D-Mannosaminuronsäure-Baustein des K7-Antigens von Escherichia coli. Eur. J. Biochem. 8, 139 - 145.

Mc Bride, B. C., and Wolfe, R. S., (1971). A new coenzyme of methyl transfer, Coenzyme M. Biochem. 10, 2317 - 2324.

Mc Inerney, M. J., and Bryant, M. P., (1978). Syntrophic associations of H_2-utilizing methanogenic bacteria and H_2-producing alkohol and fatty acid-degrading bacteria. In: Abstracts of the XII. International Congress of Microbiology, München.

Merck, (1974). "Biochemica" Enzyme, Merck-Darmstadt.

Mescher, M. F., and Strominger, J.L., (1978). The cell surface glycoprotein of Halobacterium salinarium. In: Energetics and Structure of halophilic Microorganismus. (C. S. R. Caplan and M. Ginzburg, eds.), Elsevier/North-Holland Biomedical Press.

Mills, G. L. (1950). Identification of dinitrophenylamino-acids. Nature 165, 403.

Mink, W. R., and Dugan, P. R., (1977). Tentative identification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopy. Appl. Environ. Microbiol. 33, 713 - 717.

Mort, A. J., and Lamport, T. A., (1977). Anhydrous hydrogen fluoride deglycosylates glycoproteins. Anal. Biochem. 82, 289 - 309.

Oesterhelt, D., and Stoeckenius, W., (1973). Functions of a new photoreceptor membrane. Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 2853 - 2857.

Omelianski, W., (1902). Über die Gärung der Cellulose. Zentralbl. f. Bakt. Abt. II, 8, 353 - 361, 385 - 391.

Popoff, L., (1875). Über die Sumpfgasgärung. Pflügers Arch. f. Physiol. 10, 113 - 146.

Partridge, S.M., (1949). Aniline hydrogen phthalate as a spraying reagent for chromatography of sugars. Nature 164, 443.

Perkins, H. R., (1963). A polymer containing glucose and aminohexuronic acid isolated from the cell walls of Micrococcus lysodeikticus.Biochem. J. 86, 475 - 483.

Perkins, H. R., (1967). The use of photolysis of dinitrophenyl-peptides in structural studies on the cell-wall mucopeptide of Corynebacterium poinsettiae. Biochem. J. 102,29c.

Quayle, J. R., (1972). The metabolism of one -carbon compounds in microorganism. Adv. Microb. Physiol. 7, 119 - 203.

Rao, K. R., and Sober, H. A., (1954). Preparation and properties of 2,4-dinitrophenyl-L-amino acids. J. Amer. Chem. Soc. 76, 1328 - 1331.

Reissig, J. L., Strominger, J. L., and Leloir, L. F., (1955). A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. J. Biol. Chem. 217, 959 - 966.

Reistadt, R., (1974). 2 -Amino-2-deoxyguluronic acid: a constituent of the cell wall of Halococcus sp., strain 24. Carboh. Res. 36, 420 - 423.

Rohlich, G. A., Walbot, V., Connor, L. J., Golneke, C. G., Hinesly, T. D., Jones, P. H., Lapp, H. M., Loehr, R. C., Lue-Hinq, C., Pfeffer, J. T., Prakasam, T. B. S., Brown, N. L., and Engel, J., (1977). Methane generation from human, animal and agricultural wastes. National Academy of Sciences, Washington.

Rydan, H. N., and Smith, P.W.G., (1952) A new method for the detection of peptides and similar compounds on paper chromatograms . Nature 169, 922 - 923.

Ryter, A., Kellenberger, E., Birch-Andersen, A., Maaloe, O., (1958). Etude au microscope electronique de plasmas contenant de l' acide desoxyribonucleique. Les nucleoides des bacteries en croissance active. Z. Naturforschung 13, 597 - 605.

Salton, M. R. J., (1961). Studies of the bacterial cell wall. VIII. Reaction of walls with hydrazine and with fluordinitrobenzene. Biochim. Biophys. Acta. 52, 329 - 242.

Schleifer, K. H., und Kandler, O., (1967a). Micrococcus lysodeikticus: a new type of cross-lingage of the murein. Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 965 - 972.

Schleifer, K. H., und Kandler, O., (1967b). Zur chemischen Zusammensetzung der Zellwand der Streptokokken. I. Die Aminosäuresequenz des Mureins von Streptococcus thermophilus und Streptococcus faecalis. Arch. Microbiol. 57, 335 - 364.

Schleifer, K. H., und Kandler, O. (1968). Zur chemischen Zusammensetzung der Zellwand der Streptokokken III. Die Aminosäuresequenz eines glycinhaltigen Mureins aus Peptostreptococcus evolutos (Prevot) Smith. Arch. Microbiol. 61, 292 - 301.

Schleifer, K. H., Plapp, R., und Kandler, O., (1968). Die Aminosäuresequenz des Mureins von Microbacterium lacticum. Biochim. Biophys. Acta 154, 573 - 582.

Schleifer, K. H., Huss, L., und Kandler, O., (1969). Die Beeinflussung der Aminosäuresequenz des serinhaltigen Mureins von Staphylococcus epidermis Stamm 24 (Marburg) durch die Nährbodenzusammensetzung. Arch. Microbiol. 68, 387 - 404.

Schleifer, K. H., and Kandler, O., (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. Bacteriol. Rev. 36, 407 - 477.

Searcy, D. G., (1975). Histone-like protein in the procaryote Thermoplasma acidophilum. Biochim. Biophys. Acta 395, 535 - 547.

Sentandreu, R., and Northcote, D. H., (1968). The structure of a glycopeptide isolated from the yeast cell wall. Biochem. J. 109, 419 - 431.

Shaw, D., and Moss, G. W., (1969). Quantitative estimation of neutral sugars by gas-liquid chromatography. J. Chromatogr. 41, 350 - 357.

Smith, P. H., and Mah, R. A., (1966). Kinetics of acetate metabolism during sludge digestion. Appl. Microbiol. 14, 368 - 371.

Söhngen, N. L., (1906). Het ontstaan en verdwijnen van waterstof en methaan onder den invloed van het organische leven. Dissertation, Delft.

Spiro, R. G., (1966). Characterization of carbohydrate units of glycoproteins. In: Methods in Enzymology, vol. VIII, pp. 26 - 52. (E. F. Neufeld und V. Ginsburg, eds.) Academic Press, New York-London.

Spurr, A. R., (1969). A low-Viscosity epoxy resin embedding medium for elektron microscopy. J. Ultrastruct. 26, 31 - 43.

Stadtman, T. C., and Barker, H. A., (1951). Studies on the methane fermentation IX. The origin of methane in the acetate and methanol fermentation by Methanosarcina. J. Bacteriol. 61, 81 - 86.

Stadtman, T. C., (1967). Methane fermentation. Ann. Rev. Microbiol. 21, 121 - 142.

Steber, J., and Schleifer, K. H., (1975). Halococcus morrhuae: a sulfated heteropolysaccharide as the structural component of the bacterial cell wall. Arch. Microbiol. 105, 173 - 177.

Steber, J., (1976). Dissertation, München.

Stetter, K. O., Hartlieb, R., und Winter, J., (1979). DNA-abhängige RNA-Polymerase bei Methanobacterium thermoautotrophicum. Poster, Tagung der Sektion I der DGHM, München.

Stoffyn, P. J., (1959). Ninhydrin degradation of hexosamines and periodic acid oxidation of hexoses. J. org. Chem. 24, 1360 - 1362.

Takebe, J., (1965). Extent of cross linkage in the murein sacchulus of Escherichia coli B cell wall. Biochim. Biophys Acta 101, 124 - 126.

Taylor, C. D., and Wolfe, R. S., (1974a). Structure and methylation of coenzyme M ($HSCH_2CH_2SO_3$). J. Biol. Chem. 249, 4879 - 4885.

Taylor, C. D., und Wolfe, R. S., (1974 b). A simplified assay for coenzyme M ($HSCH_2CH_2SO_3$). J. Biol. Chem. 249, 4886 - 4890.

Thauer, R. K., und Fuchs, G., (1979). Methanogene Bakterien. Ungewöhnliche Zellkomponenten und Stoffwechselwege in einer Bakteriengruppe mit phylogenetischer Sonderstellung. Naturwissenschaften 66, 89 - 94.

Tipper, D. J., (1968). Alkali-catalyzed elimination of D-lactic acid from muramic acid and its derivatives and the determination of muramic acid. Biochem. 7, 1441 - 1449.

Torii, M., Sakakibara, K., and Kuroda, K., (1973). Occurrence of 2 amino-2-deoxy-hexuronic acids as constituents of Vibrio parahaemolyticus K 15 antigen. Eur. J. Biochem. 37, 401 - 405.

Tornabene, T. G., Wolfe, R. S., Balch, W. E., Holzer, G., Fox, G. E., and Oro, J., (1978). Phytanyl-glycerol ethers and squalenes in the archaebacterium Methanobacterium thermoautotrophicum. J. Mol. Evol. 11, 259 - 266.

Trevelyan, W. E., and Procter, D. D., Harrison, J. S., (1950). Detection of sugars on paperchromatograms. Nature 166, 444 - 445.

Tzeng, S. F., Wolfe, R. S., and Bryant, M. P., (1975 a). Factor 420-dependent pyridine nucleotide-linked hydrogenase system of Methanobacterium ruminantium. J. Bacteriol. 121, 184 - 191.

Tzeng, S. F., Bryant, M. P., and Wolfe, R. S., (1975b). Factor 420-dependent pyridine nucleotide-linked formate metabolism of Methanobacterium ruminantium. J. Bacteriol. 121, 192 - 196.

Weidel, W., and Pelzer, H., (1964). Bagshaped macromolecules: a new outlook on bacterial cell walls. Advan. Enzymol. 26, 193 - 232.

Weidel, W., (1964). Ein neuer Typ von Makromolekülen, Angew. Chem. 76, 801-832.

Weimer, P. J., and Zeikus, J. G., (1977). Fermentation of cellulose and cellobiose by Clostridium thermocellum in the absence and precence of Methanobacterium thermoautotrophicum.Appl. Environ, Microbiol. 33, 289 - 297.

Weimer, P. J., and Zeikus, J. G., (1978). Acetate metabolism in Methanosarcina barkeri. Arch. Microbiol. 119, 175 - 182.

Weimer, P. J., and Zeikus, J. G., (1979). J. Bacteriol. in press.

Wellinger, A., and Wuhrmann, K., (1977). Influence of sulfide compounds on the metabolism of Methanobacterium strain AZ. Arch. Microbiol. 115, 13 - 17.

Westphal, O., and Jann, K., (1965). Bacterial lipopolysaccharides. In: Methods in Carbohydrate Chemistry, vol. V, pp. 83 - 91, (R. L. Whistler, eds.). Academic Press, New York and London.

Wheat, R. W., (1966). Analysis of hexosamines in bacterial polysaccharides by chromatographic procedures. In: Methods in Enzymology, vol. VIII, pp. 60 - 78, (E. F. Neufeld and V. Ginsburg, eds.), Academic Press, New York-London.

Wietzerbin-Falszpan, J., Das, B. C., Gros, C., Petit, J.-F., Lederer, E., (1973). The amino acids of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis var. bovis, strain BCG. J. Biochem. 32, 525 - 532.

Winfrey, M. R., and Zeikus, J. G., (1977). Effect of sulfate on carbon and electron flow during microbial methanogenesis in freshwater sediments. Appl. Environ. Microbiol. 33,275 - 281.

Woese, C. R., and Fox, G. E., (1977). Phylogenetic structure of the procaryotic domain: the primary kingdoms.Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 5088-5090.

Woese, C. R., Magrum, L. J., and Fox, G. E., (1978). Archaebacteria. J. Mol. Evol. 11, 245 - 252.

Wolfe, R. S., (1971). Microbial formation of methane. Adv. Bacteriol. Physiol. 6, 107 - 146.

Wolfe, R. S., and Winter, J., (1978). Syntrophism in methane formation and utilization. In: Abstracts of the XII. International Congress of Microbiology, München.

Zehnder, A.J.B., and Wuhrmann, K., (1977). Physiology of a Methanobacterium strain AZ. Arch. Microbiol. 111, 199 - 205.

Zeikus, J. G., and Wolfe, R. S., (1973). Fine structure of Methanobacterium thermoautotrophicum: Effect of growth temperature on morphology and ultrastructure. J. Bacteriol. 113, 461 - 467.

Zeikus, J. G., and Bowen, V. G., (1975a). Comparative ultrastructure of methanogenic bacteria. J. Microbiol. 21, 121 - 129.

Zeikus, J. G., and Bowen, V. G., (1975b). Fine structure of Methanospirillum hungatii. J. Bacteriol. 121, 373 - 380.

Zeikus, J. G., Weimer, P. J., Nelson, D. R., and Daniels, L., (1975). Bacterial methanogenesis: Acetate as a methane precursor in pure culture. Arch. Microbiol. 104, 129 - 134.

Zeikus, J. G., (1977).The biology of methanogenic bacteria. Bacteriol. Rev. 41, 514 - 541.

Zeikus, J.G., Fuchs, G., Kenealy, W., and Thauer, R. K., (1977). Oxireductases involved in cell carbon synthesis of Methanobacterium thermoautotrophicum. J. Bacteriol. 132, 604 - 613.

Zillig, W., Stetter, K. O., and Tobien, M., (1978). DNA-dependent RNA-polymerase from Halobacterium halobium. Eur. J. Biochem. 91, 193 - 199.

Zillig, W., Stetter, K. O., and Janekovic, D., (1979). DNA-dependent RNA-polymerase from the Archaebacterium Sulfolobus acidocaldarius. Eur. J. Biochem. in press.

Zhilina, T. N., (1971). The fine structure of Methanosarcina. Mikrobiologiya 40, 674 - 680.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für allgemeine Botanik der Ludwig-Maximilians-Universität in München unter der Leitung von Prof. Dr. O. Kandler vom Dezember 1976 bis April 1979 angefertigt.

Herrn Prof. Dr. O. Kandler danke ich für die großzügige Unterstützung, sowie die vielen hilfreichen Diskussionen und Anregungen, mit denen er diese Arbeit stets betreut hat.

Herrn Prof. Dr. H. Simon danke ich für die Hilfe bei der Identifizierung der Talosaminuronsäure und Herrn Prof. Dr. Mayer für die Überlassung der Analysatorchromatogramme der bisher bekannten Hexosaminuronsäuren und GalNU für Standardzwecke.

Herzlicher Dank gilt Frau Menzinger für ihre Hilfe bei der Durchführung der Analysen und Frau L. Hagner für die Durchführung der Aminosäureanalysen.

Für die Bereitstellung von Organismen für die Untersuchungen sei Herrn Prof. Dr. R. S. Wolfe, Dr. S. Schobert, Dr. J. Winter und Dr. G. Fuchs gedankt.

Für die Ascheanalysen danke ich Herrn Dr. Rosopulo (Bayer. Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau), für die C,N,H-Analyse Frau Boos (Lehrstuhl für Phytochemie, Prof. Dr. W. Rüdiger).

Herrn Dr. Formanek danke ich für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen und Diskussionen zur Stereochemie.

Herrn Dr. W. Hammes und Herrn Dr. J. Steber danke ich für die Diskussionen und experimentelle Hinweise.

Herrn Dr. N. Weiß danke ich für die Hilfe bei der gaschromatographischen Säureanalyse.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern am Botanischen Institut.

Dank gilt auch der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Lebenslauf

Name:	Helmut König
Wohnort:	8 München 19, Pilarstr. 6
geboren am:	3. Mai 1950
in:	Beltheim/Hunsrück
Eltern:	Hermann König Alwine König geb. Braun
Beruf des Vaters:	Landwirt
Familienstand:	verheiratet
Konfession:	röm. kath.
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Schulen:	1956 - 1961 Volksschule in Beltheim 1961 - 1969 Gymnasium in Biesdorf/Eifel
Wehrdienst:	1969 - 1971
Studiengang:	1971 - 1976 Universität in Heidelberg
Studienfächer:	Chemie, Biologie
Studienabschluß:	1976 Staatsexamen für das Lehramt an höheren Schulen
Aufbaustudium:	1976 - 1979 Promotion unter der Anleitung von Prof. Dr. O. Kandler, Lehrstuhl für Botanik der Universität München, 1976 - 1979 wissenschaftliche Hilfkraft